

ZUM NACHWEIS VON T-2 TOXIN
IN BLUTSERUM, HARN UND KOT

Günther Kabilka

*Diss.
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0034

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Gedek

ZUM NACHWEIS VON T-2 TOXIN IN
BLUTSERUM, HARN UND KOT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Günther Kabilka

aus
Bayreuth

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. B. Gedek
Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

Meinem Vater und Margit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) EINLEITUNG	1
B) SCHRIFTTUM	3
1. Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften von T-2 Toxin	3
2. T-2 Toxin-bildende Pilze	7
3. Wirkung von T-2 Toxin im Organismus	10
4. Nachweisverfahren für nicht-makrozyklische Trichothecene in Probenmaterialien tierischen Ursprungs	27
4.1. Prinzip	27
4.2. Physikalisch-chemische Nachweisverfahren	27
4.2.1. Extraktions- und Aufreinigungsmethoden	27
4.2.2. Gas-Flüssig-Chromatographie	29
4.3. Immuno-chemische Nachweisverfahren	35
4.3.1. Radioimmunoassay	35
4.3.2. ELISA	35
C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN	41
1. Material	41
1.1. Blut, Harn, Kot und Leber	41
1.2. Versuchstiere	41
1.3. Toxinstandards	41
1.4. Detoxifizierungsmittel	41

2. Methoden	Seite
	42
2.1. Verfahren zum physikalisch-chemischen Nachweis von Trichothecenen	42
2.1.1. Vorbereitung und Reinigung der Geräte	42
2.1.2. Herstellung von Toxinstandard	42
2.1.3. Dünnschichtchromatographie (DC)	42
2.1.4. Gas-Flüssig-Chromatographie - Flammen- ionisationsdetektion (GC-FID)	44
2.1.4.1. Derivatisation der Trichothecene	45
2.1.4.2. Chromatogrammaufzeichnung und Chromato- grammauswertung	45
2.1.4.3. Überprüfung der Linearität des GC-FID	47
2.1.5. Gas-Flüssig-Chromatographie - Massen- spektrometrie (GC - MS)	47
2.2. Versuche zur Optimierung der Analytik von Trichothecenen in einer biologischen Matrix	49
2.2.1. Extraktionsmittel	49
2.2.2.1. Ethylacetat	49
2.2.2.2. Acetonitril	49
2.2.2.3. Methanol	49
2.2.2. Aufreinigungsverfahren	50
2.2.2.1. Flüssig-flüssig Trennung	50
2.2.2.2. Präzipitation	50
2.2.2.3. Säulenchromatographische Verfahren	51
2.2.2.3.1. Säulenchromatographie mit Kieselgel 60	51
2.2.2.3.2. Säulenchromatographie mit Florisil	52
2.2.2.3.3. Säulenchromatographie mit XAD-Adsorber- harz	52
2.2.2.3.4. Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche	52
2.2.2.3.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	53

	Seite
2.2.3. Anwendung dieser Verfahren zur Verbesserung der Analytik von Trichothecenen in Blutserum, Harn und Kot	54
2.2.3.1. Artifizielle Kontamination von Blutserum, Harn und Kot	54
2.2.3.2. Geprüfte Analysenmethoden zum Trichothecen- nachweis im Blutserum	54
2.2.3.3. Geprüfte Analysenmethoden zum Trichothecen- nachweis im Harn	55
2.2.3.4. Geprüfte Analysenmethode zum Trichothecen- nachweis im Kot	57
2.4. "In vitro" Metabolismus von Trichothecenen im S-9 Leberüberstand von Schweinen	57
2.4.1. Herstellung des S-9 Leberüberstandes	57
2.4.2. Artifizielle Kontamination des Leberreaktions- gemisches mit Trichothecenen	58
2.4.3. Extraktion des S-9 Leberüberstandes	58
2.4.4. Analyse der eingesetzten Trichothecene bzw. ihrer Metaboliten	59
2.5. Untersuchungen zum Metabolismus von T-2 Toxin beim Schwein	60
2.5.1. Haltung und Fütterung	60
2.5.2. Toxinapplikation	60
2.5.3. Probenentnahme und Probenaufbewahrung	61
2.5.4. Analyse der Proben	62
2.5.4.1. Analyse der Blutserumproben	62
2.5.4.2. Analyse der Harnproben	62
2.5.4.3. Analyse der Kotproben	62
2.5.4.4. Analyse des Erbrochenen	62

3. Ergebnisse und deren Besprechung	Seite 66
3.1. Ergebnisse der Untersuchungen zum gaschromato- graphischen Nachweis von Trichothecenen	66
3.2. Ergebnisse der Versuche zur Optimierung der Analytik von Trichothecenen in einer bio- logischen Matrix	70
3.2.1. Ergebnisse der Analysenmethoden zum Tricho- thecennachweis im Blutserum	70
3.2.2. Ergebnisse der HPLC-Trennung von Standard- toxinen	73
3.2.3. Ergebnisse der Analysenmethoden zum Tricho- thecennachweis im Harn	73
3.2.4. Ergebnisse der Analysenmethode zum Tricho- thecennachweis im Kot	77
3.3. Ergebnisse der "in vitro" Versuche zum Metabolismus von Trichothecenen im S-9 Leber- überstand von Schweinen	80
3.4. Ergebnisse der Untersuchung zum T-2 Toxin- Metabolismus beim Schwein	82
3.4.1. Ergebnisse der Analyse von Blutserum, Harn, Kot und Erbrochenem von Schweinen nach oraler Belastung mit T-2 Toxin	82
3.4.2. Ergebnisse der Analyse von Blutserum, Harn und Kot von Schweinen nach intravenöser Belastung mit T-2 Toxin	86
D) DISKUSSION	93
E) ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	102
F) LITERATURVERZEICHNIS	108

A) EINLEITUNG

T-2 Toxin und dessen natürlich vorkommende Derivate sind Fusarientoxine, die als sekundäre Stoffwechselprodukte von Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildet werden; Fusarien sind Saprobionten und primär Erreger von Pflanzenkrankheiten (SPICHER, 1981).

Die in gemäßigten Klimazonen ubiquitär vorkommenden Fusarien sind in der Lage Lebens- und Futtermittel pflanzlicher Herkunft bereits vor der Ernte zu befallen. Es bedarf also nicht erst einer unsachgemäßen Lagerung damit es zur Anreicherung mit diesen Toxinbildner in Futtermitteln kommt. Bei ausreichender Substratfeuchte kann allerdings auch während der Lagerung eine von niedrigen Temperaturen begünstigte Toxinbildung, wie bereits auf der Pflanze auftreten (BAUER und GEDEK, 1978).

Daß Fusarientoxine auch in der Bundesrepublik Deutschland von Bedeutung sind, belegen die von GAREIS et al. (1985) veröffentlichten Ergebnisse der Untersuchung von 294 Futtermittelproben auf das Vorhandensein von nicht-makrozyklischen Trichothecen; so konnten in 9 von 42 im biologischen Test (Hauttoxizitätstest an Meerschweinchen) positiven Proben eindeutig Trichothecene (T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol und Neosolaniol) analysiert werden.

Die Verfütterung von trichothecenhaltigen Futtermitteln bewirkt beim Tier vor allem Erbrechen, Futterverweigerung, Haut- und Schleimhautreizung, sowie eine erhöhte Anfälligkeit gegen Infektionskrankheiten bei Aufnahme geringer Toxinmengen über einen längeren Zeitraum. Darüber hinaus wurden Hämorrhagien der Schleimhaut, besonders der Darmmukosa, und sogar Todesfälle nach Aufnahme von größeren Mengen Trichothecen gesehen. Durch den Verzehr von fusarienhaltigen Grundnahrungsmitteln pflanzlichen Ursprungs besteht auch die Gefahr einer direkten Schädigung der menschlichen Gesundheit. Als Beispiel sei hier die Alimentäre Toxische Aleukie erwähnt, an der zwischen 1941 und 1947 über 10 % der Bevölkerung des Distrikts Orenburg

(Sowjetunion) nach Verzehr von auf dem Feld überwintertem fusarienhaltigem Getreide erkrankten.

Nicht geklärt ist bislang, ob eine Gefährdung des Menschen durch "carry over" von Trichothecenen über Nahrungsmittel tierischen Ursprungs besteht.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es deshalb empfindliche Nachweismethoden für Trichothecene - speziell für T-2 Toxin - zu entwickeln, die es gestatten Aussagen über Stoffwechsel und Ausscheidung von T-2 Toxin beim Schwein, einer für Fusarien-toxine besonders empfänglichen Tierart (BAUER u. GEDEK, 1978), zu machen.

Zugleich sollte durch Untersuchung von Material bereits durchgeführter "in vivo" Versuche festgestellt werden, inwieweit eine Möglichkeit besteht, in Blutserum, Harn oder Kot einen Nachweis von T-2 Toxin für die Diagnosestellung zu führen.

B) SCHRIFTTUM

1. Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften von T-2 Toxin

T-2 Toxin gehört zur Gruppe der Trichothecene; die Bezeichnung Trichothecen leitet sich vom Trichothecin ab, dem ersten bei der Suche nach antibiotisch wirksamen Substanzen rein dargestellten Toxin dieser Stoffklasse. Trichothecin wird von *Trichothecium roseum* LINK (FREEMAN u. MORRIS, 1949) gebildet.

Die zu den Sesquiterpenoiden gehörenden Trichothecene weisen ein trizyklisches Trichothecan-Gerüst auf, besitzen eine olefinische Bindung zwischen dem C-9 und dem C-10 Atom und eine Epoxydgruppe bei C-12,13; dadurch sind sie als 12,13 Epoxytrichothec-9-ene charakterisiert (GODTFREDSEN et al., 1967; TAMM, 1977; PATHRE u. MIROCHA, 1977).

T-2 Toxin wurde als 3-Hydroxy-4,15-diacetoxy-8(3-methylbutyryloxy)12,13epoxytrichothec-9-en bestimmt (vgl. Abbildung 1) (COLE u. COX, 1981). Die Summenformel des T-2 Toxins lautet $C_{24}H_{34}O_9$; sein Molekulargewicht beträgt 466,2193 (COLE u. COX, 1981).

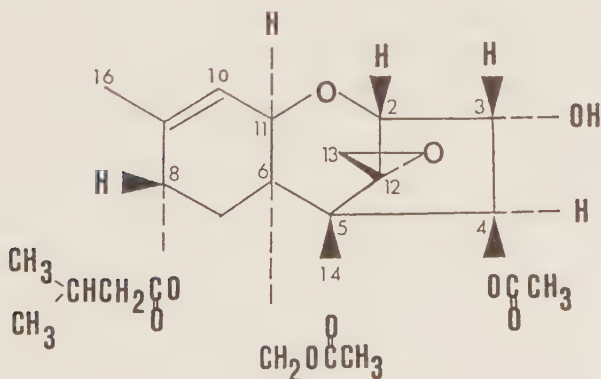


Abbildung 1: Chemische Grundstruktur des T-2 Toxins

UENO (1980) ordnet das T-2 Toxin auf Grund seiner chemischen Struktur in die erste von vier Trichothecengruppen ein; während sich die erste und die zweite Gruppe nur durch das Fehlen oder Vorhandensein der Ketogruppe am C-8 Atom unterscheiden, ist die dritte Gruppe (Crotocol und Crotocin) durch zwei Epoxydgruppen im Molekül gekennzeichnet; die makrozyklischen Trichothecene bilden die vierte Gruppe.

T-2 Toxin ist, wie alle Trichothecene, eine farblose, kristalline Verbindung mit einer hohen chemischen Stabilität (BAMBURG u. STRONG, 1971; UENO, 1977a; MIROCHA, 1979). Der Schmelzpunkt von T-2 Toxin liegt bei 151-152°C (COLE u. COX, 1981). Das in organischen Lösungsmitteln stabile T-2 Toxin ist in Chloroform, Aceton, Ethylacetat und Alkoholen gut löslich, während seine Löslichkeit in Wasser gering ist (TAMM, 1977; UENO, 1980). Längeres Kochen in Wasser, eine Säurehydrolyse (pH 3) oder die Reduktion mit LiAlH_4 bewirken ein Öffnen des Epoxydringes (BAMBURG u. STRONG, 1971; TAMM, 1977), was zu einem teilweisen Verlust der biologischen Aktivität führt (UENO, 1977a; ISHII, 1983).

Daß auch die Seitenketten des T-2 Toxin-Moleküls bei der biologischen Aktivität eine wichtige Rolle spielen zeigten BAMBURG und STRONG (1971) und MIROCHA (1983a); so konnte eine Toxizitätsabschwächung nach Deacetylierung am C-4 Ester des T-2 Toxins mit anschließender Hydroxylierung zu HT-2 Toxin beobachtet werden. Ebenso führte die Substitution der Isovaleryl-Seitenkette des T-2 Toxins durch eine Hydroxylgruppe (Neosolanol) zum teilweisen Verlust der ursprünglichen Toxizität (MIROCHA, 1983a).

Da T-2 Toxin keine UV-Absorption oder Fluoreszenz aufweist, (TAKITANI u. ASABE, 1983) sind die unterschiedlichen Farb- und Fluoreszenzreaktionen nach Behandlung mit Schwefelsäure (UENO et al., 1973b), p-Anisaldehyd (SCOTT et al., 1970; STAHR et al., 1979), 4-(p-Nitrobenzyl)pyridin (TAKITANI et al., 1979) und Nicotinamid-2-acetylpyridin (SANO et al., 1982) für die Analytik von T-2 Toxin mittels Dünnschichtchromatographie von besonderer Bedeutung.

Die wichtigsten Farb- und Fluoreszenzreaktionen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt; für die Dünnschichtchromatographie mit unterschiedlichen Fließmitteln wichtige R_f-Werte zeigt Tabelle 2.

Weitere für die Analytik von T-2 Toxin wichtige Daten sind die bei der Massenspektrometrie entstehenden Schlüsselionen des nicht derivatisierten T-2 Toxin-Moleküls, des T-2 Toxin-Tri-methylsilylethers und des T-2 Toxin-Trifluoracetylethers (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 1 : Farb- bzw. Fluoreszenzreaktionen des T-2 Toxins nach Behandlung mit verschiedenen Sprühreagenzien

Sprühreagenz	Farbe nach Besprühen	Fluoreszenz nach Besprühen (bei 360 nm)	Referenz
Schwefelsäure p-Anisaldehyd 4-(p-Nitrobenzyl)pyridin* Nicotinamid-2-acetylpyridin*	grau-braun violett	blau blau blauviolett blau	UENO et al., 1973b SCOTT et al., 1970 TAKITANI u. ASABE, 1983 SANO et al., 1982

*Spezifische Reaktion des Sprühreagenz mit der 12,13 Epoxygruppe

Tabelle 2 : Rf-Werte von T-2 Toxin auf Kieselgel 60 DC-Platten

Fließmittel	Mischungsverhältnis	Rf-Wert	Referenz
Chloroform/Methanol	95 : 5	0,528	} TAKITANI u. ASABE, 1983
Benzol/Aceton	1 : 1	0,55	
Chloroform/Aceton	3 : 2	0,52	
Benzol/Tetrahydrofuran	85 : 15	0,16	
Ethylacetat/Toluol	3 : 1	0,41	
Ethylacetat/n-Hexan	3 : 1	0,61	
Chloroform/Isopropanol/Ethylacetat	95 : 5 : 5	0,68	
Chloroform/Ethanol/Ethylacetat	90 : 5 : 5	0,78	} COLE u. COX, 1981 PATHRE u. MIROCHA, 1977
Chloroform/Methanol	98 : 2	0,40	
Chloroform/Methanol	97 : 3	0,364	
Benzol/Aceton	3 : 2	0,620	

Tabelle 3 : Massenspektrometrische Daten von T-2 Toxin und T-2 Toxin-Derivaten

Toxin bzw. Toxin-derivate	Ionisations-methode	Molekülion	Massenfragmente	Referenz
T-2 Toxin	EI	466	364 / 304 / 85	COLE u. COX, 1981
T-2 Toxin-TMS	EI	538	436 / 350 / 290	CHAYTOR u. SAXBY, 1982
T-2 Toxin-TFA	EI	562	401 / 180 / 85	GAREIS et al., 1985
T-2 Toxin	CI**	467***	407 / 365 / 305	SMITH u. UDSETH, 1983
T-2 Toxin	CI*	466	140 / 87 / 74	BRUMLEY et al., 1982
T-2 Toxin-TMS	CI	539***	479/437/377/317 1)	
T-2 Toxin-TFA	CI	563***	401	GAREIS et al., 1985

1) persönliche Mitteilung: Dr. Manfred Gareis, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin

EI: Elektronenstoßionisation

TMS: Trimethylsilylether

CI: Chemische Ionisation (Methan)

TFA: Trifluoracetylether

*: Chemische Ionisation mit negativen Ionen (OH⁻)

***: Chemische Ionisation mit Pentan oder Isobutan

***: protoniertes Molekülion

3. T-2 Toxin bildende Pilze

T-2 Toxin wird von Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildet; die Bezeichnung *Fusarium* wurde erstmals 1908 von LINK verwendet. In der Systematik der Pilze gehören die Fusarien innerhalb der Unterabteilung Deuteromycotina zur Familie der Tuberculariaceae (GEDEK, 1980).

Gibberella zeae, die Fruchtkörper bildende Form (= perfekte Form) von *Fusarium graminearum* (= imperfekte Form), ist ebenfalls zur T-2 Toxin-Bildung befähigt (BURMEISTER et al., 1972). Die zur saprophytischen und parasitären Lebensweise befähigten Fusarien sind auf der Erde ubiquitär verbreitet und verursachen durch Wachstum und Toxinbildung unterschiedliche Pflanzenerkrankungen (Fusariosen) (MALALASEKERA et al., 1973).

In den Kulturen werden häufig makroskopisch sichtbare, wollige, flockige oder filzige, aus feinen, fadenförmigen Röhren (Hyphen) bestehende Geflechte (Luftmycel) gebildet (MÜLLER, 1974); mitunter ist dieses Luftmycel nur geringgradig ausgebildet, was der *Fusarium*kultur dann ein schleimiges Aussehen verleiht.

Darüber hinaus sind Fusarienkulturen durch eine kräftige Pigmentierung, die zwischen weiß, gelb, orange, kaminrot, purpur, violett, braun und dunkelbraun variiert, gekennzeichnet (WOLLENWEBER, 1932; BOOTH, 1971).

Mikroskopisch sind die Fusarien durch sichel- oder spindelförmige (fusiforme) septierte oder unseptierte Sporen (Makro- und Mikrokonidien) charakterisiert (BOOTH, 1971).

Unterschiedliche Substrat- und Umweltfaktoren spiegeln sich in einer morphologischen Varianz der Fusarienkulturen wider, was eine Vielfalt von Artenbezeichnungen zur Folge hat.

WOLLENWEBER und REINKING (1935), BUGNICOURT (1939), SNYDER und HANSEN (1945), GORDON (1952), BILAI (1955), GERLACH (1970), BOOTH (1971), JOFFE (1974) und JOFFE und PALTÍ (1975) stellten jeweils unterschiedliche taxonomische Systeme auf.

Die so entstandene Systemvielfalt und die damit verbundenen taxonomischen Schwierigkeiten konnten bis heute noch nicht ausgeräumt werden.

Die Fusarienbestimmung erfolgt heute zumeist nach dem System von SNYDER und HANSEN (1945), oder nach dem in der Hauptsache auf WOLLENWEBER und REINKING (1935) aufbauenden System nach BOOTH (1971).

Tabelle 4 erfaßt die T-2 Toxin-bildenden Fusarienarten mit ihrer Sektionszugehörigkeit nach BOOTH (1971).

Tabelle 4: T-2 Toxin-bildende Fusarienarten mit ihrer Sektionszugehörigkeit nach BOOTH (1971)

Sektion	Species (Synonyme)	Referenz
Martiella	<i>F. solani</i> (<i>F. ventricosum</i>)	UENO et al., 1972 UENO et al., 1973 b UENO et al., 1973 b
Spicarioides	<i>F. decemcellulare</i> (<i>F. rigidusculum</i>)	
Sporotrichiella	<i>F. poae</i> (<i>F. tricinatum</i>) <i>F. tricinatum</i> (<i>F. citrifforme</i>)	UENO et al., 1973 b BURMEISTER et al., 1972
Arthrosporiella	<i>F. sporotrichioides</i> (<i>F. tricinatum</i>) (<i>F. sportrichiella</i>) <i>F. avenaceum</i> <i>F. semitectum</i> (<i>F. incarnatum</i>)	SZATHMAY et al., 1976 UENO et al., 1973 b BURMEISTER et al., 1971
Lateritium	<i>F. lateritium</i>	BURMEISTER et al., 1972
Elegans	<i>F. oxysporum</i>	SAITO u. OHTSUBO, 1974
Gibbosum	<i>F. equiseti</i> (<i>F. scirpi</i>) <i>F. acuminatum</i> (<i>F. roseum</i>)	BURMEISTER et al., 1971 WERNTER, 1980
Discolor	<i>F. culmorum</i> <i>F. graminearum</i> (<i>F. roseum</i>) <i>F. sulphureum</i> (<i>F. sambucinum</i>)	UENO et al., 1973 b BURMEISTER et al., 1972 ICHINOE u. KURATA, 1983

4. Wirkung von T-2 Toxin im Organismus

Ergebnisse von Versuchen über die Wirkung von T-2 Toxin liegen vom Schwein, Hund, Katze, Wiederkäuer, Geflügel, Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Affe und Regenbogenforelle vor (vgl. Tabelle 6).

Die tierartlich unterschiedliche und von der Art der Applikation abhängige Empfindlichkeit gegenüber T-2 Toxin spiegelt sich in der Dosis, bei der 50% eines Kollektives sterben (LD_{50}), wider (vgl. Tabelle 5).

Wirkung (akut) nach einmaliger T-2 Toxin-Applikation

Klinik:

Eine einmalige intravenöse Applikation von 1,5 mg/kg KGW T-2 Toxin löste 15 Minuten nach der Toxingabe Erbrechen, Apathie, schwankenden Gang, eine über 19 Stunden anhaltende Hinterhandparese und häufigen Kotabsatz bei Schweinen aus; während ein Schwein (30,9 kg) 24 Stunden nach Toxininjektion klinisch wieder ohne Besonderheiten war, führte die gleiche Dosis T-2 Toxin bei einem anderen Schwein 12 Stunden nach Toxingabe zum Tod (WEAVER et al., 1978a).

Die akuten Auswirkungen einer T-2 Toxin-Gabe auf die Gravitätät einer Sau (letztes Drittel der Gravitätät) zeigten WEAVER et al. (1978b); so kam es 48 Stunden nach intravenöser Applikation von 0,41 mg/kg KGW zum Abort von Feten und einer mumifizierten Frucht.

Erbrechen nach intravenöser bzw. oraler T-2 Toxin-Applikation wurde auch bei der Taube (0,15 mg/kg KGW i.v.; 0,72 mg/kg KGW oral) und beim Hund (0,25 mg/kg KGW i.v.) (ELLISON u. KOTSONIS, 1973), beim Affen (0,5-1,0 mg/kg KGW oral) (RUKMINI et al., 1980) und nach subkutaner Toxininjektion bei der Katze (0,5-1,0 mg/kg KGW) (SATO et al., 1975) gesehen.

Tabelle 5: LD₅₀-Werte (mg/kg KGW) von T-2 Toxin bei verschiedenen Tierarten

Tierart	Applikationsart und die zugehörige LD-50 in mg/kg KGW				Referenz
	oral	i.v.	i.m.	i.p.	s.c.
Schwein	4,0	1,21 ± 0,15			SMALLEY, 1973 WEAVER et al., 1978a; WEAVER et al., 1980; WEAVER et al., 1981; UENO, 1983
Rind (nicht ruminierend)	0,6				RIBELIN, 1978
Ratte	4,0				MARASAS et al., 1969; BAMBURG et al., 1969; SMALLEY, 1973
	3,8				KOSURI et al., 1971
	3 - 4				SCHOENTAL et al., 1979
			0,47	2,18	BRENNECKE u. NEUFELD, 1982
	5,2				UENO, 1983; UENO, 1984 CHAN u. GENTRY, 1984
Maus (adult)	3,8		0,85	0,03	
					BAMBURG et al., 1968
				3,0	BURMEISTER et al., 1971
				5,2	UENO et al., 1972; UENO, 1977 a
					COLE u. COX, 1981
(4 Wochen alt) (neugeboren)	3,04				UENO, 1983; UENO, 1984
	10,5	4,2		5,2	UENO, 1983; UENO, 1984
					UENO, 1983; UENO, 1984

Fortsetzung Tabelle 5:

Tierart	oral	i.v.	i.m.	i.p.	s.c.	Referenz
Hund		1,1				SATO u. UENO, 1977
Katze					0,5	SATO u. UENO, 1977
Meerschweinchen	2,0 3,06					SATO u. UENO, 1977 DE NICOLA et al., 1978; UENO, 1983
Kaninchen			1,0 1,1			SATO u. UENO, 1977 CHAN u. GENTRY, 1984
Haushuhn	3,6 1,84					SATO u. UENO, 1977 COLE u. COX, 1981
Legehennen (24 Wochen)	6,27 ± 0,42 a)					CHI et al., 1977 b
Broiler (8 Wochen)	4,97 ± 0,25 a) 2,9 b) 4,97					CHI et al., 1977 b HOERR et al., 1982 a UENO, 1983
Küken (1 Tag alt)	5,03 ± 0,25 a) 4,97 ± 0,44 c) 1,75					CHI et al., 1977 b CHI et al., 1978 a UENO, 1983 HOERR et al., 1981a; UENO, 1983
(7 Tage alt)	4,0					
Embryo (5 Tage)	0,06 d) 0,07 d)					STAHR et al., 1979 UENO, 1977 b

Fortsetzung Tabelle 5:

Tierart	oral	i.v.	i.m.	i.p.	s.c.	Referenz
Taube	2,75					ELLISON u. KOTSONIS, 1973
Forelle	6,1 6,5					MARASAS et al., 1967; SATO u. UENO, 1977 UENO, 1983 SMALLEY, 1973
Brine Shrimps	0,47 e) 0,06 f) 0,08 g)					HARWIG u. SCOTT, 1971 EPPLEY, 1974

a) T-2 Toxin Applikation 10 Tage

b) T-2 Toxin Applikation 14 Tage

c) T-2 Toxin Applikation 7 Tage

d) µg/ Ei

e) µg/ ml Medium

f) µg/ ml Medium bei 30°C Medientemperatur

g) µg/ ml Medium bei 39°C Medientemperatur

Ataxien der Hinterbeine der Katze nach subkutaner Gabe von 0,5 - 1,0 mg T-2 Toxin/kg KGW (SATO et al., 1975) und des Kalbes nach oraler Applikation von 0,6 mg/kg KGW T-2 Toxin (WEAVER et al., 1980) sind beschrieben.

Blutgerinnungsstörungen wurden nach einmaliger, intravenöser T-2 Toxin-Applikation beim Kaninchen, beim Kalb und beim Meerschweinchen beobachtet; als Ursache hierfür wurde eine Aktivitätsverminderung der Blutplasmafaktoren VII, VIII, IX, X, XI (Kaninchen) bzw. VII, IX, X, XI (Kalb) und eine Erhöhung (Kaninchen) bzw. Verminderung (Kalb) des Fibrinogengehaltes des Blutes bestimmt (GENTRY, 1982; GENTRY u. COOPER, 1983; COSGRIFF et al., 1984). Hingegen wurden Störungen der Blutgerinnung beim Schwein nach intravenöser Applikation von 1,5 mg/kg KGW nicht diagnostiziert (WEAVER et al., 1978a).

Pathologie:

Pathologisch-anatomisch konnten beim Schwein nach Injektion von 1,5 mg/kg KGW Veränderungen an Jejunum, Ileum, Caecum, der Mesenteriallymphknoten und der Milz festgestellt werden.

Pathologisch-histologisch stellten sich diese als Kernschrumpfung und Kernzerfall in den Mukosaepithel- und Kryptenzellen von Ileum und Jejunum, in den Peyer'schen Platten, den Mesenterial- und Caecallymphknoten, sowie den Lymphfollikel der Milz dar; T-2 Toxin-induzierte Hämorrhagien, wie sie z.B. bei der Ratte von YAROM et al. (1983) beschrieben werden, wurden beim diesem Schwein nicht gesehen (WEAVER et al., 1978a).

Gleichartige pathologisch-anatomische Veränderungen, wie sie WEAVER et al. (1978a) beim Schwein beschreiben, wurden auch bei anderen Tierarten gesehen; so dokumentieren DE NICOLA et al. (1978) nach einmaliger oraler T-2 Toxin-Applikation (1,8 bzw. 4,6 mg/kg KGW) Nekrosen im Lymphgewebe von Meerschweinchen. SATO et al., (1975) konnten Nekrosen in der Dünn- und Dickdarmmukosa der Katze nach einmaliger subkutaner Injektion von 0,1 - 0,5 mg T-2 Toxin pro kg KGW diagnostizieren. Ferner wurden nach

T-2 Toxin-Gabe Hämorrhagien in Lunge und Herz (Toxingabe: 2 mg/kg KGW i.p.) bei der Ratte (YAROM et al., 1983), in Lunge und Meningen (Toxingabe: 0,1-0,5 mg/kg KGW s.c.) bei der Katze (UENO et al., 1973a) und in der Magenschleimhaut (Toxingabe: 5-40 mg/kg KGW perkutan) bei der Maus (SCHIEFER und HANCOCK, 1984) festgestellt.

Wirkung (chronisch) nach mehrmaliger T-2 Toxin-Applikation

Klinik:

Die über 8 Wochen mit einer täglichen Dosis von 0,33 mg/kg KGW (dies entspricht 8 mg/ kg Futter) oral belasteten Schweine, zeigten nur während der ersten Woche eine deutlich geringere Futteraufnahme als die Kontrolltiere (WEAVER et al., 1978a). Erst eine Konzentration von 16 mg T-2 Toxin pro kg Futter führt bei Schweinen zur Futterverweigerung (WEAVER et al., 1978a).

Eine 80 bzw. 220 Tage andauernde Verfütterung einer mit T-2 Toxin kontaminierten Ration (12 mg/kg Futter) induzierte bei Sauen Fertilitätsstörungen (Umrauschen) (WEAVER et al., 1978c). Sonstige klinische Erscheinungen, wie z.B. die bei der Ratte von MARASAS et al. (1969) nach mehrmaliger oraler Aufnahme von T-2 Toxin haltigem Futter (5-15 mg/kg Futter) gesehenen Entzündungen der Nase und des Maules, oder die von WYATT et al. (1972) und CHI et al. (1977a) beobachteten Entzündungen mit Plaquebildung und Nekrosen am harten Gaumen, Zungenrand, -unterseite und -papillen von Küken (Toxingehalt des Futters: 20 mg T-2 Toxin/kg bzw. 4 mg T-2 Toxin/kg), wurden nicht gesehen.

Abweichungen von den Labornormwerten (Blutbild, Gesamtprotein, Laktatdehydrogenase, Alkalische Phosphatase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase) konnten bei Schweinen, die täglich mit 0,33 mg/kg KGW T-2 Toxin belastet wurden, nicht diagnostiziert werden (WEAVER et al., 1978a).

Dagegen wurden Veränderungen der biochemisch faßbaren Parameter nach T-2 Toxin-Applikation bei anderen Tierarten nachgewiesen. Als Hauptsymptom der Blutwertveränderungen wurde eine Leukopenie bei der Katze (UENO et al., 1973a; SATO et al., 1975; LUTSKY u. MOR, 1981b), beim Schaf (FRIEND et al., 1983), bei der Maus (HAYES u. SCHIEFER, 1980), beim Affen (RUKMINI et al., 1980) und beim Meerschweinchen (DE NICOLO et al., 1978) gesehen.

RAFAI und TUBOLY (1982) diskutieren nach "in vitro" Versuchen eine immunsuppressive Wirkung von T-2 Toxin beim Schwein. Eine tägliche über 5 Wochen andauernde orale Applikation von 0,1 mg T-2 Toxin/kg KGW bewirkt beim Affen eine Absenkung der IgG und IgM Antikörper und eine Reduktion der B- und T-Lymphozyten (JAGADESSAN et al., 1982). Beim Kalb verursacht T-2 Toxin (0,5 mg/kg KGW oral; 28 Tage) eine Verminderung der α , β_1 , β_2 und γ Globuline (MANN et al., 1982) und bei der Maus (2 mg/kg KGW i.p.; 7 Tage) eine Hemmung der DNA- und Proteinsynthese (ROSENSTEIN u. LA FARAGE-FRAYSSINET, 1983).

Pathologie:

Die Schweine, die über 8 Wochen mit T-2 Toxin (tägliche Dosis: 0,33 mg/kg KGW) belastet wurden, zeigten pathologisch-anatomisch und anatomisch-histologisch keinerlei Veränderungen (WEAVER et al., 1978a). Hingegen wurden bei anderen Tierarten nachstehende T-2 Toxin induzierte pathologische Veränderungen gesehen. RUKMINI et al. (1980) diagnostizierten nach einer 15 tägigen oralen Toxinapplikation von 0,1 mg/kg KGW beim Affen Nekrosen im Lymphgewebe; Nekrosen und Atrophien in Thymus, Lymphknoten und Knochenmark der Ratte und des Kükens werden von SCHOENTAL et al. (1979) und HOERR et al. (1981a) beschrieben. Von Hämorrhagien im Herzen und im gesamten Verdauungstrakt berichten LUTSKY et al. (1978) bei der Katze und KOSURI et al. (1970) beim Rind.

Genaue Daten über die T-2 Toxin-Wirkung bei den einzelnen Tieren sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Klinische Befunde (K), Laborbefunde (L), pathologisch-anatomische und/oder pathologisch-histologische Befunde (P) nach Verabreichung von T-2 Toxin bei verschiedenen Tierarten

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
<u>Schwein</u> (3 - 50 kg)	0,13 - 3,2mg/kg KGW i.v.	K: Erbrechen, Hinterhandparese, Apathie, häufiger Kotabsatz Blutbild, Cholesterin, AP, LDH, GPT, GOT u. Hb o.B. P: Darmtrakt: Nekrosen der Mukosaepithel- u. Kryptenzellen von Jejunum u. Ileum; Nekrosen der Peyer'schen Platten, der Mesenterial- u. Caecallymphknoten u. der Milzfollikel; Gefäßstauungen Meningen: gestaute Gefäße	WEAVER et al., 1978a
<u>Läufer</u>	16 mg/kg Futter	K: Futterverweigerung	WEAVER et al., 1978a
	5 mg/kg Futter (25 Tage)	K: Gewichtszunahme gering, Leukozyten verringert, Plasma- cortisol erhöht. P: Verdauungstrakt: Nekrosen an Lippen- u. Maulschleimhaut Milz: Gewicht verringert Thymus: Gewicht verringert Nebennierenrinde: vergrößert	RAFAI u. TUBOLY, 1982
<u>Sau</u> (gravid letz- tes Dritte)	0,41 mg/kg KGW bzw. 0,21 mg/kg KGW i.v.	K: Erbrechen, Apathie, Abort 48 bzw. 80 Stunden nach Injektion; Leukozytenzahl verringert; Hb, GOT u. GPT o.B.	WEAVER et al., 1978b
	12 mg/kg Futter (80 bzw. 220 Tage)	K: Geburt kleiner Ferkel; Fertilitätsstörungen (Umrauschen) P: Verdauungstrakt: Hyperämie der Darm- u. Gallenblasenmukosa	WEAVER et al., 1978c

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
Rind			
Kalb (295 kg)	0,25 mg/kg KGW i.m. (3 Tage) + 0,12 mg/kg KGW i.m. (4 Tage) + 0,06 mg/kg KGW i.m. (34 Tage) + 0,11 mg/kg KGW oral (1 Tag) + 0,10 mg/kg KGW i.m. (23 Tage)	K: Abszeß an Injektionsstelle, Gewichtsverlust, Inappetenz, Diarrhoe (hämorrhagisch), gerötete Schwanzspitze, Tod Dyspnoe, verlängerte Prothrombinzeit, AP erniedrigt, GOT erhöht, Blutcholesterin erhöht P: Verdauungstrakt: Hämorrhagien in der Mukosa von Rumen, Abomasum u. Darm; hämorrhagische Mesenterialknoten Herz: Blutungen im Epikard Leber: fettige Degeneration	KOSURI et al., 1970
Stier	0,1 mg/kg KGW i.m. (65 Tage)	K: s.o. P: s.o.	GROVE et al., 1970
Kuh (gravid)	0,44 mg/kg KGW oral (15 Tage)	K: Futterverweigerung ab 0,50 mg/kg KGW T-2 Toxin Geburt eines Kalbes nach 4 Tagen Toxinapplikation, Laktation normal P: Verdauungstrakt: Pansenulcus; Pansen-, Labmagen u. Jejunalf Gefäße gestaut; Ödem der Submucosa von Blind- u. Dickdarm	WEAVER et al., 1980
Kalb (neugeboren)	0,6 mg/kg KGW oral	K: Ataxien; Apathie; Anorexie	WEAVER et al., 1980

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
Kalb (neugeboren)	0,6 mg/kg KGW oral	K: verlängerte Prothrombinzeit u. verlängerte partielle Thromboplastinzeit	WEAVER et al., 1980
Kalb	0,2 mg/kg KGW oral (bis 11. Tage)	K: Blutgerinnungsstörung (herabgesetzte Aktivität der Plasmafaktoren VII, IX, X u. XII; Plasmafibrinogen vermindert)	PATTERSON et al., 1979
Kalb	0,25 mg/kg KGW i.v.	K: Absenkung des α_1 , β_1 , β_2 - u. β_2 -Globulingehaltes des Blutes; Verminderung der IgM u. IgA-Antikörper	GENTRY u. COOPER, 1983
Kalb	0,6 mg/kg KGW oral (43 Tage)	K: Senkung der Serumproteine (α_1 , β_1 - u. β_2 -Globulinsenkung; Plasmaproteinurie; Verminderung der IgA u. IgM-Antikörper)	MANN et al., 1982
Kalb	0,5 mg/kg KGW oral (28 Tage)	K: dosisabhängiger Anstieg der B-Lymphozyten u. Abfall der T-Lymphozyten	MANN et al., 1983
Kalb	0,3 mg/kg KGW oral (56 Tage) bzw. 0,5 mg/kg KGW oral (28 Tage)		MANN et al., 1984
<u>Schaf</u> Lamm (6 - 8 Wochen)	0,6 bzw 0,3 mg/kg KGW oral Über 21 Tage	K: Diarrhoe, struppiges Fell, Hyperämie u. Dermatitis an der Lippen Schleimhaut, proliferative Glossitis, dosisabhängige Knochenmarksschäden (Erythropoesehemmung), reversible Leukopenie, Lymphopenie, verlängerte Prothrombinzeit P: Allgemeinzustand: wenig Körperfett, Verdauungstrakt: proliferative Entzündung am harten Gaumen, feuchte, vergrößerte Mesenteriallymphknoten, herdförmige Ruminitis mit Parakeratose Milz: zellarme weiße Pulpa Lymphknoten: Mark geschwollen, Rinde dünn Thymus: Atrophie	FRIEDL et al., 1983

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
<u>Hund</u>	0,25 mg/kg KGW i.v.	K: Erbrechen 35 Minuten nach Injektion	ELLISON et al., 1973
<u>Katze</u>	0,1 - 0,5 mg/kg KGW s.c.	K: 2 Stunden nach Injektion: Erbrechen, Diarrhoe, Anorexie Ataxie der Hinterbeine, Leukopenie nach anfänglicher Leuko- zytose P: Meningen: Blutungen Lunge: Blutungen	UENO et al., 1973a
	0,5 - 1,0 mg/kg KGW s.c.	K: s.o.; zusätzlich: Nausea, Untertemperatur, Apathie u. Liegen Tod 20 Stunden nach Toxingabe P: Darmtrakt: Nekrosen in Dünn- u. Dickdarmmukosa Niere: vakuoläre Degeneration der Nierentubuli	SATO et al., 1975
	0,1 - 0,05 mg/kg KGW s.c. mehrere Tage	K: s.o., zusätzlich: Absinken des Hämatokritwertes u. des Hämoglobingehaltes P: Lunge u. Niere: s.o. Thymus, Milz, Lymphknoten, Knochenmark: Atrophie	SATO et al., 1975
	0,1 bzw. 0,08mg/kg KGW oral mehrere Tage	K: s.o.; zusätzlich: reduzierte Gewichtszunahme, mukopurulenter Nasen- u. Augenausfluß, Thrombozytopenie P: Haut: Petechien in der Subkutis Darmtrakt: hämorrhagische Magenschleimhaut, vergrößerte u. hämorrhagische Mesenteriallymphknoten Herz: Petechien im Myokard Tonsillen: Hämorrhagien u. Nekrosen	LUTSKY et al., 1978 LUTSKY u. MOR, 1981a LUTSKY u. MOR, 1981b

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
<u>Affe</u>	1 - 0,5 mg/kg KGW (15 Tage) oral	K: Erbrechen, Apathie, Diarrhoe, petechiale Blutungen im Gesicht, Dyspnoe, Leukopenie, Tod nach 8 -15 Tagen, Anämie Besonders ausgeprägte Symptome bei männlichen Tieren P: Lunge: graue Hepatisations Milz: Gewichtsreduktion u. Follikelatrophie Lymphknoten: Nekrosen	RUKMINI et al., 1980
	0,1 mg/kg KGW (15 Tage) oral	K: Leukopenie, Teilchte Anämie	RUKMINI et al., 1980
	0,1 mg/kg KGW (4-5 Wochen) oral	K: Leukopenie, IgG u. IgM Absenkung, Verminderung der T- und B-Lymphozyten P: Herz: Perikarditis Lunge: abszedierende Pneumonie	JAGADEESAN et al., 1982
<u>Kaninchen</u>	0,5 mg/kg Kgw i.v.	K: HK-Senkung; Leukopenie; Verminderung der Aktivität der Blutgerinnungsfaktoren VII, VIII, IX, X u. XI und Verminderung der Plasmafibrinogenkonzentration	GENTRY u. COOPER, 1981 GENTRY, 1982
	2,0 mg/kg KGW oral	K: Diarrhoe; haarlose Stellen in Nasenbereich; membranöse Beläge im Maul	GENTRY u. COOPER, 1981
<u>Meerschweinchen</u>	1,85, 2,52, 3,45 oder 4,66 mg/kg KGW oral (Schlundsonde)	K: Lethargie u. Tod ab Toxinmengen von 2,52 mg/kg KGW P: Verdauungstrakt: Hyperämie u. Hämorrhagien im Magen, Caecum u. Darmlymphknoten; Ulcera im Magen u. Dickdarm Lymphknoten: Nekrosen Knochenmark: Nekrosen Hoden: Nekrosen Nebenniere: Nekrosen	DE NICOLA et al., 1978

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
Meerschweinchen	0,9 mg/kg KGW oral (27 Tage)	K: s.o., zusätzlich: Anämie	DE NICOLA et al., 1978
	1,0 mg/kg KGW i.m.	K: anfängliche Leukozytose (Lymphozytose u. Neutrophilie) dann nach 72 h Leukopenie nach 6 h Hämatokritanstieg, nach 72 h HK- Abfall Blutgerinnungsstörung (verlängerte Prothrombinzeit u. verlängerte partielle Thromboplastinzeit)	COSGRIFF et al., 1984
<u>Ratte</u>	5 bzw. 15mg/kg Futter (3 Wochen)	K: verminderte Gewichtszunahme; Dermatitis im Nasen- u. Maulbereich reich P: Fettige Leberdegeneration	MARASAS et al., 1969
	0,12 bzw. 1,47 bzw. 1,3 mg T-2 Toxin auf die Haut aufgetropft	K: Hyperämie, Schwellung u. Nekrose der Haut an der Applikationsstelle	MARASAS et al., 1969
	0,2 - 4 mg/kg KGW oral (1 - 8x) bis zu 27,5 Monate	K: Diarrhoe; Blutungen aus Körperöffnungen; Koma; Tod P: Verdauungstrakt: Hyperkeratose u. Hyperplasie des Darm- u. Magenepithels; petechiale Blutungen in Magen u. Darm; Magenulzera; submukoses Ödem in Magen u. Duodenum Pankreas: intralobuläres Ödem Lunge: gestaut Herz: Myokarddegeneration Epithelkörperchen: Hyperplasie Thymus: Atrophie u. Nekrose Milz u. Lymphknoten: vergrößert Niere: vergrößert, kalifiziert Herde	SCHOENTAL et al., 1979

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
Ratte	1x 2mg/kg KGW oral	K: Blutdruckerhöhung	WILSON et al., 1982
	nach 3 Monaten	P: Kreislaufsystem: Intimaverdickung mit Endothelschwund;	
	1x 2mg/kg KGW oral	perivaskuläre Fibrose; Kalzifizierung der Gefäßwände	
	nach 6 Monaten	Epithelkörperchen: Hyperplasie	YARON et al., 1983
	1x 1mg/kg KGW oral	Verdauungstrakt: Neoplasmen im Magen u. Pankreas	
	nach 12 Monaten		
	1x 3mg/kg KGW oral		HAYES et al., 1980 HAYES u. SCHIEFER, 1980
	2 bzw. 3 mg/kg KGW i.p.	P: Lunge : Hämorrhagien	
		Herz: Hämorrhagien, interstitielles Ödem, Koronargefäßverengung	
<u>Maus</u>	20 mg/kg Futter oral (- 6 Wochen)	K: verminderte Futteraufnahme; vermindertes Wachstum; Lethargie; periorale Dermatitis; Anämie; Lymphopenie; Anämie	ROSENSTEIN et al., 1979 ROSENSTEIN u. LAFFARGE-FRAYSSINET, 1983
		P: Verdauungstrakt: Hyperkeratose der Oesophagus- u. Magenmukosa; Ulzera im Magen; Peyer'sche Platten atrophisch	
		Thymus: Atrophie Milz: Gewicht verringert; nach 6 Wochen Hyperplasie der roten Pulpa (Regeneration des hämatopoetischen Systems)	
		Knochenmark: Hyperplastisch nach 4 Wochen (Regeneration)	
	0,5- 2 mg/kg KGW i. p. (7 Tage)	K: Immunsuppression: DNA- u. Proteinsynthesehemmung in Milz, Thymus u. Knochenmark DNA- u. Proteinsynthese in der Leber gesteigert (zeitweise) Gewichtsverminderung	

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
Maus	6 - 12x 0,1 mg T-2 Toxin oral	K: Immunsuppression	KANAI u. KONDO, 1984
	2 - 100 mg/l Trink- wasser	K: Trinkwasserverweigerung ab 40 mg T-2 Toxin/ l Wasser	BURMEISTER et al., 1980
Hausuhn			
Legehennen	20 mg/kg Futter (mehrere Tage) 16 mg/ kg Futter 0,5, 1, 2, 4 bzw. 8 mg/kg Futter	K: Gewichtszunahme vermindert; Legeleistung herabgesetzt; Eier mit dünner Schale; gelbe, käsige, proliferierende Plaques in der Mukosa von Zunge, hartem Gaumen und Schnabelwinkel; Leukopenie; Serumprotein und Serumlipide vermindert	HAMILTON et al., 1974 WYATT et al., 1975 a SPEERS et al., 1977 CHI et al., 1977a
Hühner (6 Wochen)	0,350 mg/kg KGW i.m.	K: verminderte Futteraufnahme; GOT, GPT u. LDH Aktivität erhöht; verminderte AP Aktivität P: Leber: vergrößert mit Hämorrhagien Pankreas: atrophiert	PEARSON, 1978
Broiler (- 9 Wochen)	4,0 mg/kg Futter	K: Veränderungen im Schnabelbereich s. o.; vermindelter Cholesterinspiegel; verminderte LDH u. AP Aktivität	CHI et al., 1977b
(4 Wochen)	1x 2,5 mg/kg KGW oral	P: Dopaminkonzentration im Gehirn erhöht	CHI et al., 1981

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
Küken (7 Tage)	2,0 bzw. 2,5 mg/kg KGW oral (7Tage) 1,5 - 3,0 mg/kg KGW oral (14 Tage) 50 bzw. 100 bzw. 300 mg/kg Futter (7 Tage)	K: Gewichtszunahme vermindert; herabgesetzte Futteraufnahme; Plaquerbildung im Schnabelbereich s.o.; verminderter HK; P: Verdauungstrakt: Epithelnekrosen im Duodenum, Proventrikel u. Ventrikel; Hyperplasie des Gallenganges; Nekrose des Epithels der Gallenblase Leber: multiple, fokale Koagulationsnekrose; Stauung u. Hämorrhagien Lymphgewebe: Nekrosen in Thymus, Milz, Bursa Fabricii u. Lymphknoten Knochenmark: Nekrosen Befiederung: Nekrose der Federfollikel	HOERR et al., 1981b HOERR et al., 1982a HOERR et al., 1982b
Eintagsküken	1 bzw. 2 bzw. 4 bzw. 8 bzw. 16 mg/kg Futter (mehrere Tage)	K: s.o.; neurale Störungen (Stellreflexe beeinträchtigt, Flügelhaltung abnorm); Befiederungsstörungen; Blutgerinnungsstörungen (verminderte Aktivität der Gerin- nungsfaktoren VII u. X; verminderte Prothrombin u. Fibrino- genkonzentration P: s.o.	WYATT et al., 1972 WYATT et al., 1973a WYATT et al., 1973b WYATT et al., 1975b CHI u. MIROCHA, 1978 DOERR et al., 1981
	5 mg/kg KGW injiziert in Dottersack	P: Degeneration u. Nekrosen in der Bursa Fabricii	TERA0 et al., 1978
<u>Taube</u>	0,15 mg/kg KGW i.v.	K: Erbrechen 10 bzw. 35 Minuten nach Toxingabe	ELLISON et al., 1973
	0,72 mg/kg KGW oral	K: Erbrechen 30 Minuten nach Toxingabe, Tod	ELLISON et al., 1973

Fortsetzung Tabelle 6:

Tierart	T-2 Toxin Dosierung	Beobachtung	Referenz
<u>Ente</u>	20 - 30 mg/kg Futter (mehrere Tage)	K: Gewichtszunahme vermindert, Dermatitis u. Hyperkeratose am Schnabelwinkel; Tod P: Haut: vermindertes subkutaness Fettgewebe Verdauungstrakt: Entzündungen mit Plaquebildung an Zunge, Gaumen, Pharynx, Oesophagus u. Proventrikel Bursa fabricii: Atrophie Thymus: Atrophie	HAYES u. WOBESER, 1983
<u>Forelle</u>	200 - 400 mg/kg Futter	K: Gewichtszunahme und Längenwachstum verlangsamt	MARASAS et al., 1969

4. Nachweisverfahren für nicht-makrozyklische Trichothecene in Materialien tierischen Ursprungs

4.1. Prinzip

Für den Nachweis von nicht-makrozyklischen Trichothecenen in Probenmaterialien tierischen Ursprungs (Blutserum, Harn, Kot, Milch, Gewebe, Pansensaft) werden bislang vor allem physikalisch-chemische Verfahren, wie die Gas-Flüssig-Chromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID) (KIESSLING et al., 1984), die Gas-Flüssig-Chromatographie - Elektroneneinfangdetektion (GC-ECD) (SWANSON et al., 1982), und die Gas-Flüssig-Chromatographie - Massenspektrometrie (GC-MS) (YOSHIZAWA et al., 1981) angewandt. Darüber hinaus werden immunochemische Verfahren, wie der Radioimmunoassay (RIA) (LEE u. CHU, 1981) und der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (PETERS et al., 1982; GENDLOFF et al., 1984), eingesetzt.

Dem qualitativen und quantitativen Nachweis gehen bei den physikalisch-chemischen Nachweismethoden Extraktions- und Aufreinigungsschritte voraus, die die Aufgabe haben mit den Toxinen interferierende Substanzen weitgehend abzutrennen. Die Dünnschichtchromatographie, ein weiteres physikalisch-chemisches Nachweisverfahren für Trichothecene, und die biologischen Nachweisverfahren (Hauttoxizitätstest, Hühnerembryotest, Brine Shrimps Test und Zellkulturtest) kommen auf Grund ihrer geringen Nachweisempfindlichkeit und Spezifität bei der Trichothecenanalyse aus Materialien tierischen Ursprungs nicht zum Einsatz.

4.2. Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

4.2.1. Extraktions- und Aufreinigungsmethoden

Zur Extraktion von Trichothecenen aus Probenmaterialien tierischen Ursprungs haben sich organische Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität bewährt.

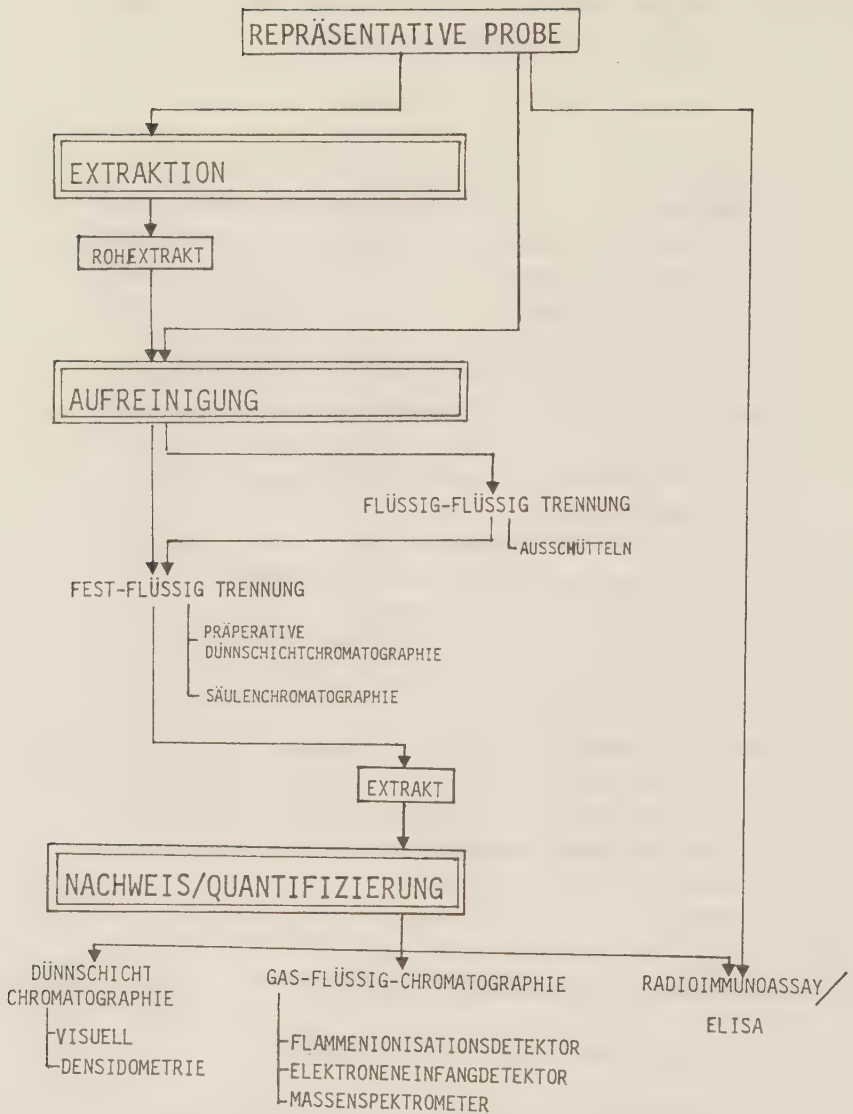


Abbildung 2 : Schematische Darstellung der Trichothecen-Analyse in Materialien tierischen Ursprungs

Acetonitril (MIROCHA et al., 1983; VISCONTI u. MIROCHA, 1985), Methanol (MATSUMOTO et al., 1978), Aceton (YOSHIZAWA et al., 1981), Benzol (SWANSON et al., 1983) und Ethylacetat (COLLINS u. ROSEN, 1979; LEE u. CHU, 1981; KIESLING et al., 1984; BAUER et al., 1985) werden als Extraktionsmittel erfolgreich eingesetzt.

Der gewonnene Rohextrakt wird über mehrere Aufreinigungsschritte weitgehend von Substanzen befreit, die mit den Toxinen interferieren. Zur Anwendung kommen hierbei die Flüssig-Flüssig-Trennung (ROBISON et al., 1979; VISCONTI u. MIROCHA, 1985) und verschiedene Fest-Flüssig-Trennungsvorgänge, wie die Zentrifugation (ROBISON et al., 1979; CARSON u. SMITH, 1983), die Präzipitation (ROBISON et al., 1979), präperative Dünnschichtchromatographie (COLLINS u. ROSEN, 1979) und die Säulenchromatographie mit unterschiedlichen stationären Phasen (MATSUMOTO et al., 1978; SWANSON et al., 1982; YOSHIZAWA et al., 1982; CARSON u. SMITH, 1983; MIROCHA et al., 1983; BAUER et al., 1985; VISCONTI u. MIROCHA, 1985).

4.2.2. Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC)

In der Gas-Flüssig-Chromatographie erfolgt die Trennung eines Stoffgemisches an einer von einem Trägergas durchströmten chromatographischen Säule. Ein Flammenionisations-, Elektroneneinfangdetektor oder Massenspektrometer dienen zum Nachweis der von einander getrennten Substanzen (KAISER, 1973; RICHTER u. SCHWARZ, 1978).

Vor der gaschromatischen Analyse muß die Flüchtigkeit der Trichothecene durch Derivatisierung der freien Hydroxygruppen erhöht werden.

Als Derivatisierungsmittel haben sich vor allem bis-Tri-methylsilyl-acetamid mit Trimethylchlorosilan (5+1) (= Tri-Sil-BT) (YOSHIZAWA et al. 1980a) und N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (= MBTFA) (PATHRE et al., 1976; MIROCHA et al., 1983) bewährt.

Heptafluorbutyrylimidazol (=HFBI) eignet sich als Derivatisationsmittel bei Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors (GC-ECD) (ROMER et al., 1978; SCOTT et al., 1981; SWANSON et al., 1983).

Die derivatisierten Probenextrakte können an gepackten Säulen oder an Kapillarsäulen chromatographiert werden (YOSHIZAWA et al., 1982; MIROCHA et al., 1983). Bei gepackten Säulen werden als flüssige, stationäre Phase häufig Methylsilicon SE-30 (ROMER et al., 1978) und Methylphenylsilicon (OV-17) (UENO et al., 1975) eingesetzt.

Einen Überblick über häufig verwendete Derivatisationsmittel und Chromatographiesäulen bei der Analyse von T-2 Toxin gibt Tabelle 7.

Die Identifizierung der einzelnen Toxine in einer Probe erfolgt bei der Gas-Flüssig-Chromatographie durch den Vergleich ihrer, von der Säulentemperatur und von der Durchfußgeschwindigkeit des Trägergases abhängigen, Retentionszeiten mit den Retentionszeiten der entsprechenden Standardtoxine.

Die Quantifizierung in der GLC erfolgt ebenfalls im Vergleich zu Standardtoxinen, wobei die in den Chromatogrammen zur charakteristischen Retentionzeit auftretenden Peaks in Höhe und Fläche der Menge der injizierten Substanz proportional sind.

Eine einwandfreie Identifizierung von Toxinen in einer Probe ist mit Hilfe der Massenspektrometrie möglich. In der Massenspektrometrie werden die Toxine im Anschluß an die Gas-Flüssig-Chromatographie durch Elektronenstoß (EI) oder chemische Ionisation (CI) mittels Reaktandgas ionisiert (WATSON et al. 1984; VISCONTI u. MIROCHA, 1985), wobei neben den Molekülonen charakteristische Massenfragmente entstehen (vgl. Tabelle 4).

Die Empfindlichkeit der Massenspektrometrie kann im "Selected ion monitoring" (SIM) Betrieb dadurch erhöht werden, daß die Analyse auf 3 - 4 charakteristische Ionen begrenzt wird (VISCONTI u. MIROCHA, 1985).

Tabelle 7: Gaschromatographische Bedingungen für den Nachweis von nicht-makrozyklischen Trichothecen

SÄULE Länge (m) x Breite (mm)	TEMPERATUR (°C)	TRÄGERGAS (ml/min)	DERIVATISATION- MITTEL	DETEKTOR	ERFASSTE SUBSTANZEN Retentionzeit in min	NACHWEIS- GRENZE	REFERENZ
Kapillarsäule	fused silica	300*	HFBI	ECD	T-2 : 49,97	100 pg	COHEN u.
	DB - 5	225-280** R:15			HT-2 : 44,20	25 pg	LAPORTE, 1984
	30 x 0,32	350***			DAS : 39,92	100 pg	
	fused silica	275*	TFAA	MS	Acetyl-T-2: 14,30	n.a.	VISCONTI et al., 1985
	DB - 5	80-300** R:20			3'-OH-T-2: 12,52		
	30 x 0,25				" Isomer: 12,94		
					T-2: 12,35		
					3'-OH-HT-2: 11,20		
					" Isomer: 11,50		
					HT-2: 11,10		
					Neosolaniol : 10,76		
					T-2 Triol : 10,40		
					4-ac.T-2 Tetr.: 9,90		
					8-ac.T-2 Tetr.: 9,56		
					15-ac.T-2 Tetr.: 9,40		
					T-2 Tetraol: 8,78		
	fused silica	250*	TFAA	MS	3'-OH-T-2: 13,2	n.a.	PAWLOSKY et al., 1984
	(DB - 5)	80-300** R:30			" Isomer: 13,8		
	SE - 54	270****			T-2: 12,9		
	30 x 0,25				3'-OH-HT-2: 11,2		
					" Isomer: 11,5		
					HT-2: 10,9		

Fortsetzung Tabelle 7:

SÄULE		TRÄGERGAS	DERIVATISATION- MITTEL	DETEKTOR	ERFASSTE SUBSTANZEN Retentionzeit in min	NACHWEIS- GRENZE	REFERENZ
Länge (m) x Breit (mm)	TEMPERATUR (°C)	(ml/min)					
3 % OV-1 1,8 x 2	250* 230** 325***	Argon/ Methan 95/5 (22)	HFBI	ECD	T-2 : 8,60	25 pg	SWANSON et al., 1983
3 % OV-1 1 x 32	n.a.* 150-275** R:6 n.a.***	Stickstoff (20)	Tr-1/Sil-BT oder PFPI oder N-trifluoracetyl- acetamid	FID	T-2: 7,6	n.a.	MIROCHA et al., 1976
1,5 % OV-17 1,5 x 4	280* 180-280** R:5 300***	Stickstoff (60)	BSA:SIM:TMCS = 5:5:1	FID	HT-2: 8,6 T-2: n.a. T-2 Triol: T-2 Tetraol:	n.a.	UENO et al., 1983b
2-5 % SE-30 oder SE-52 oder QF-1 1,5 x 45	n.a.* 210** o. 238** o. 160-250** R:5 n.a.***	Stickstoff (30)	Pyridin:HMDS:TMCS =7:2:1 oder BSA:Pyridin = 4:1	FID	T-2: 17,3 HT-2: n.a. DAS: 11,0 T-2 Tetraol: n.a.	n.a.	IKEDIOBI et al., 1971
3 % SE-30 1,2 x 2	205* 200** 325***	n.a. (24)	HFBI	ECD	T-2: 12,0 DAS: 7,1	0,15 ng 0,15 ng	ROMER et al., 1978
3 % OV-3 1,83 x 2	225* 170** 225***	Stickstoff (52)	HFBI	ECD	T-2: 12,2 HT-2: 5,7 DAS: 3,5	0,15 ng 0,15 ng 0,15 ng	SCOTT et al., 1981
3 % OV-17 1 x 2	275* 255** 285***	Helium (30)	BSTFA	FID MS	T-2: 3,35	n.a.	COLLINS u. ROSEN, 1981

gepackte Säule

Fortsetzung Tabelle 7:

SÄULE Länge (m) x Breit. (mm)	TEMPERATUR (°C)	TRÄGERGAS (ml/min)	DERIVATISATION- MITTEL	DETEKTOR	ERFASSTE SUBSTANZEN Retentionzeit in min	NACHWEIS- GRENZE	REFERENZ
3 % OV-15 1 x 3	250* 150-290** R:8 250***	Stickstoff (30)	Tr-i/Sil-BT MBIFA	FID	TMS- Ether Ac. T-2: 14,70 14,70 Diac. Neo: 13,65 13,65 T-2: 12,73 11,04 HT-2: 11,87 7,80 Deac. HT-2: 10,38 5,73 Neo: 10,16 6,97 4-Deac. Neo: 9,24 3,99 15-Deac. Neo: 8,01 5,15 3-Ac. T2Tet: 9,00 5,31 T-2 Tet: 7,35 2,52	n.a.	YOSHIZAWA et al., 1980b
3 % OV-17 1,6 x 2	280* 200-280** R:8 300***	Stickstoff (30)	Tr-i/Sil TBT	FID	T-2: 11,2 HT-2: 10,4 DAS: 6,4 T-2 Tetraol: 5,2	50 ng	CULLEN et al., 1982
1,5 % OV-17 1,5 x 2 oder 3 % SE-30	280* 250** oder 180-280 R:5 300***	Stickstoff (60)	DMSO:SIM:TMCS= 1:4:0,5 oder BSA:SIM:TMCS= 5:5:1	FID	BSA:SIM:TMCS Acetyl- T-2: 20,0 T-2: 17,8 HT-2: 16,4 Neosolanol: 13,6 DAS: 12,4 MAS: 10,4	50 ng 50 ng	OHTA et al., 1977

gepackte Säule

4.3. Immuno-chemische Nachweisverfahren

4.3.1. Radioimmunoassay

Ein Radioimmunoassay (RIA) zur Identifizierung und Quantifizierung von T-2 Toxin in Serum-, Harn-, Milch- und Futtermitteiprobe n wird von LEE u. CHU (1981) und von FONTELO (1983) beschrieben. Nach Zugabe einer definierten Menge radioaktiv-markierten T-2 Toxins und einer aus Kaninchenserum nach Injektion von (BSA)-T-2 Toxin-HS (bovines Serumalbumin- T-2 Toxin-Hemisuccinat) gewonnenen, genau eingestellten Anti-Serumverdünnung gegen T-2 Toxin zu einem Probenextrakt, wird das Stoffgemisch präzipitiert. Das Verhältnis von gebundenem radioaktiv-markiertem T-2 Toxin im Präzipitat und freiem radioaktiv-markiertem T-2 Toxin im Überstand wird mit einem Scintillationsspektrometer ermittelt. Dieses Verhältnis entspricht dem Verhältnis von gebundenem nicht radioaktiv-markiertem im Präzipitat und freien nicht radioaktiv-markiertem T-2 Toxin im Überstand.

4.3.2. ELISA

Peters (1982) beschreibt einen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von T-2 Toxin.

Zur Produktion eines spezifischen Antiserum gegen T-2 Toxin wird T-2 Toxin-Hemisuccinat an Rinderalbumin gekoppelt. Die T-2 Toxin-Antiserumgewinnung erfolgt durch Immunisierung von Kaninchen mit diesem Konjugat (CHU et al., 1979; LEE u. CHU, 1981; PETERS et al., 1982).

Nach Beschichtung einer Polystyrol-Oberfläche mit Poly-D-Lysin wird T-2 Toxin-Hemisuccinat an das adsorbierte Polypeptid gekoppelt. T-2 Toxin-Antiserum wird nun zugegeben. Die ersten Antikörperbindungen werden durch Zugabe eines anti-Kaninchen-Immunglobulins, an das das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, nachgewiesen. Nach Hinzufügen einer Substratlösung (2-2'-Azino-

Azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfat) / H_2O_2) wird die Absorption des Stoffgemisches bei 414 nm gemessen. In Anwesenheit von freiem T-2 Toxin während des ersten Testschrittes kommt es zu einer Suppression der Antigen-Antikörperreaktion mit dem an der Polysterolwand gebundenem T-2 Toxin-Hemisuccinat, was sich in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Absorption des Stoffgemisches widerspiegelt (PETERS et al., 1982).

Die bislang in praxi eingesetzten Analysenverfahren von nicht-makrozyklischen Trichothecenen in Körperflüssigkeiten, Exkreten und Organen, deren Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten sind Tabelle 8 aufgezeigt.

Tabelle 8: Nachweisverfahren von Trichothecen in Körperflüssigkeiten, Exkreten und Organen

PROBE	TOXINE	EXTRAKTIONS- MITTEL	AUFREINIGUNG	NACHWEIS- SYSTEM	NACHWEIS- GRENZE	WIEDERFINDUNGS- RATE (in %)	REFERENZ
<u>SERUM</u>							
M	T-2 Toxin	Ethylacetat	Sep-Pak C18*	RIA	0,5 ng/ml	87 - 106	LEE u. CHU, 1981
M	T-2 Toxin	keine	kein	RIA	1 - 10 ng/ml	59,8 - 126,8	Fontelo et al., 1982
R	T-2 Toxin +Metabol.	keine	XAD* UC präperativ	Sc.-Spek.			YOSHIZAWA et al., 1981
M	T-2 Toxin HT-2 Toxin	Aceton	XAD*	GC-MS (CI;SIM)			MIRICIA et al., 1983 WATSON et al., 1984
	T-2 Toxin	Benzol	Flüssig-Flüssig Tren. Floristil*	GC-ECD	25 ng/ml	98 ± 5,5	SHANSON et al., 1983
S	DAS	keine	Sep-Pak C18*	GC ECD	25 ng/ml	90 ± 7,8	SHANSON et al., 1982
S	DAS	Ethylacetat	Sep-Pak C18* Floristil	GC-MS (CI;SIM)	10 ng/ml	61	BAUER et al., 1985
S	MAS	Ethylacetat	Sep-Pak C18* Floristil*	GC-MS (CI;SIM)	10 ng/ml	45	BAUER et al., 1985
S	Sc	Ethylacetat	Sep-Pak C28* Floristil*	GC-MS (CI;SIM)	25 ng/ml	40	BAUER et al., 1985

PROBE HARN	TOXINE	EXTRACTIONS - AUFRÄUIGUNG MITTEL	NACHWEIS - SYSTEM	NACHWEIS - GRENZE	WIEDERFINDUNGS- RATE (in %)	REFERENZ
M	T-2 Toxin HT-2 Toxin	keine keine	XAD* Sep-Pak C18 *			
S	DAS	keine	Sep-Pak C18* Florisisl*	100 ng/ml	92,3 ± 6,7	MIROCHA et al., 1983 SHANSON et al., 1982
M	T-2 Toxin	keine	keine			
M	T-2 Toxin	Ethylacetat	Sep-pak C18*	RIA RIA	59,8 - 126,8 88 - 117	FONTELO et al., 1982 LEE u. CHU, 1981
R	T-2 Toxin +Metabol.	keine	XAD* Florisisl*	GC-MS		YOSHIZAWA et al., 1982
Ra	T-2 Toxin +Metabol.	Methanol	Sep-Pak C18* DC präperativ Kieselgel* DC präperativ	Sc.-Spek.		MATSUMOTO et al., 1978
R	T-2 Toxin +Metabol.	keine	XAD* Florisisl*	Sc.-Spek.		YOSHIZAWA et al., 1981
EXKRETE						
II	T-2 Toxin +Metabol.	Acetonitril	Flüssig-Flüssig Tre. XAD* Florisisl* Sep-Pak C18* DC präperativ	SC.-Spek. GC-MS (SIM;CI) GC-FID		YOSHIZAWA et al., 1980 a
II	T-2 Toxin +Metabol.	Acetonitril	XAD* DC präperativ Florisisl* Sep-Pak C18*	GC-MS (SIM;CI)		VISCONTI u. MIROCHA, 1985

Fortsetzung Tabelle 8 :

PROBE	TOXINE	EXTRAKTIONS- MITTEL	AUFREINIGUNG-	NACHWEIS - SYSTEM	NACHWEIS - GRENZE	WIEDERFINDUNGS- RATE (in %)	REFERENZ
<u>KOT</u>							
Ra	T-2 Toxin	Methanol	Kieselgel*	Sc.-Spek.			MATSUMOTO et al., 1978
	HT-2 Toxin		DC präperativ				
R	T-2 Toxin	Acetonitril	Flüssig-Flüssig Tren.	Sc.-Spek.			YOSHIZAWA et al., 1981
	+Metabol.		XAD*				
			Florisil*				
<u>ORGANE</u>							
II	T-2 Toxin	Acetonitril	XAD*	GC-MS (SIM;CI)			VISCONTI u. MIROCHA, 1985
	+Metabol.		DC präperativ				
			Florisil*				
			Sep-Pak C 18*				
H	T-2 Toxin	keine	keine	Sc.-Spek.		95 - 112	CHI et al., 1978 b
	+Metabol.						
M	DAS	Acetonitril	XAD*	GC-MS (SIM;CI)			MIROCHA et al., 1983 WATSON et al., 1984
	T-2 Toxin						
	HT-2 Toxin						
<u>PANSEN- SAFT</u>							
R	T-2 Toxin	Ethylacetat	Flüssig-Flüssig Tren.	GC-FID	10 ng/ml	67	KIESSLING et al., 1984
			Sep-Pak C18*				
R	DAS	Ethylacetat	Flüssig-Flüssig Tren.	GC-FID	2 ng/ml	82	KIESSLING et al., 1984
			Sep-Pak C18*				

Fortsetzung Tabelle 8:

PROBE	TOXINE	EXTRAKTIONS- MITTEL	AUFREINIGUNG	NACHWEIS- SYSTEM	NACHWEIS- GRENZE	WIEDERFINDUNGS- RATE (in %)	REFERENZ
<u>MILCH</u>							
R	T-2 Toxin	Ethylacetat	Dc präoperativ	GC-MS (EI;CI)	6 ng/ml	65 bei 20µg/kg 85 bei 200µg/kg	COLLINS u. ROSEN, 1979
R	T-2 Toxin	keine	Sep-Pak C18*	RIA	2,5 ng/ml	88 - 117	LEE u. CHU, 1981
R	T-2 Toxin	keine	Fest-Flüssig Tren. ¹ Flüssig-Flüssig Tren. Dc präoperativ	GC-MS (CI;SIM)	5 - 10 ng/ml	50	ROBISON et al., 1979
S	T-2 Toxin	keine	Fest-Flüssig Tren. ¹ Flüssig-Flüssig Tren. Dc präoperativ	GC-MS (CI;SIM)	25-35 ng/ml	50	ROBISON et al., 1979
R	T-2 Toxin +Metabol.	Aceton	Fest-Flüssig Tren. ² Flüssig-Flüssig Tren. XAD* Florisil* Dc präoperativ	Sc.-Spek.			YOSHIZAWA et al., 1981

RIA: Radioimmunoassay

GC-MS: Gas-Flüssig-Chromatographie-Massenspektrometrie

GC-FID: Gas-Flüssig-Chromatographie-Flammenionisationsdetektor

GC-ECD: Gas-Flüssig-Chromatographie-Elektroneneinfangdetektor

DC: Dünnschichtchromatographie

CI: chemische Ionisation

EI: Elektronenstoßionisation

SIM: Selected ion monitoring

Sc.-Spek.: Scintillations-Spektrometer

M: Mensch

S: Schwein

R: Ratte

H: Huhn

Ra: Ratte

1: Präzipitation

2: Filtration

*: Säufenchromatographie

DAS: Diacetoxyscirpenol

MAS: Monoacetoxyscirpenol

Sc: Scirpentriol

C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material

1.1. Blut, Harn, Kot und Leber

Zur Optimierung der Extraktions- und Analysenmethoden für T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolaniol und T-2 Tetraol und zur Bestimmung der Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten dieser Trichothecene wurde Blutserum, Harn und Kot von Schweinen verwendet.

Zur Gewinnung von S-9 Leberüberständen dienten unmittelbar nach der Schlachtung entnommene Schweinelebern.

1.2. Versuchstiere

Drei weibliche Läuferschweine der Deutschen Landrasse mit einem Gewicht von 18,8 - 20,0 kg standen als Versuchstiere zur Verfügung.

1.3. Toxinstandards

Folgende Trichothecene fanden als Toxinstandards Verwendung: T-2 Toxin (Sigma, T 4887), HT-2 Toxin (Sigma, T 4138), T-2 Triol (Sigma, T 4013), T-2 Tetraol (Sigma, T 3888), Neosolaniol (Wako Pure Chemical, 141-04681).

1.4. Detoxifizierungsmittel

6%ige Natriumhypochloritlösung wurde zur Detoxifizierung aller toxinhaltigen Glaswaren, Lösungen und Probenmaterialien verwendet.

2. Methoden

2.1. Verfahren zum physikalisch-chemischen Nachweis von Trichothecenen

2.1.1. Vorbereitung und Reinigung der Geräte

Vor Gebrauch wurden alle Glaswaren mit Methanol und anschließend mit Chloroform gespült.

Die für die Probeninjektion verwendete Mikroliterspritze (Hamilton, 1801 RNE, 10µl, gasdicht, Nr:84877) wurde vor jeder Probeninjektion durch mehrmaliges Aufziehen von Chloroform gereinigt.

2.1.2. Herstellung des Toxinstandards

Kristallines T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolaniol und T-2 Tetraol wurden abgewogen und in Methanol gelöst, so daß eine Konzentration von 200 µg/ml Methanol zu erwarten war. Die so hergestellte Stammlösung diente zur artifiziellen Kontamination von Blutserum, Harn und Kot, sowie zur Identifizierung und Quantifizierung von Trichothecenen bei dünnschichtchromatographischen, gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analysenverfahren.

2.1.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung wurden Kieselgel 60 DC-Platten (Merck, Art.5721) und HPTLC-Kieselgel 60 F 254 Platten ohne Konzentrierungszone (Merck, Art. 5628) und mit Konzentrierungszone (Merck, Art. 13727) eingesetzt.

Alle DC-Platten wurden in Trennkammern (100x200x200 mm), die mit 200 ml einer Mischung aus Chloroform (Merck, Art. 2445) und Aceton (Merck, Art.14) im Verhältnis 3 : 2 beschickt waren, eindimensional chromatographiert und anschließend luftgetrocknet.

Die Sichtbarmachung der Trichothecene erfolgte entweder durch Besprühen mit 20 %iger Schwefelsäure (Merck, Art.716) und anschließendem Erhitzen auf 120°C für 20 min (UENO et al., 1972), oder durch die von SANO et al (1982) beschriebene Methode:

- Tauchen der DC-Platten in eine 4 %ige Nicotinamidlösung (Merck, Art.6818); Lösungsmittel: Aceton : Ethanol (Merck, Art.983) = 5 : 1,
- lufttrocknen und erwärmen auf 160°C für 15 min,
- tauchen in ein 3 %ige Acetylpyridinlösung (EGA Chemie, Nr.A2 100-2) in n-Hexan (Merck, Art.4368) und lufttrocknen,
- besprühen mit Kaliumhydroxid (2N) (Merck, Art. 5033) gelöst in 80 %igem Ethanol und lufttrocknen,
- tauchen in ein Gemisch aus Ameisensäure (Merck, Art.264) und Diethylether (Merck, Art.921) im Verhältnis 3 : 7,
- lufttrocknen und für 4 min auf 100°C erwärmen.

Die Auswertung der DC-Platten erfolgte unter einem UV-Betrachter (CAMAG) bei einer Wellenlänge von 366 nm. Zur Identifizierung der Trichothecene wurden Farbe (grau-braun), Fluoreszenz (blau) und Rf-Werte der einzelnen Spots herangezogen.

2.1.4. Gas-Flüssig-Chromatographie - Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

Die Gas-Flüssig-Chromatographie erfolgte mit einem Gaschromatographiegerät der Firma Carlo Erba (Fractocap 4200) mit Flammenionisationsdetektor.

Als Trennsäule diente eine 15 m lange Fused Silica Capillary Column (Durabond-5, SE-54) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 μm (ICT Handelsgesellschaft, Nr. 122-5012).

Die Trichothecene wurden unter folgenden Bedingungen analysiert:

-Trärgas: Helium
-Trärgasdruck: 0,6 kg/cm
-Temperaturprogramm:

Zeit (min)	Temperatur (°C)	Temperaturanstieg (°C/min)
0.- 3,0.	140	0
3,0.- 9,6.	140 - 240	15
9,6.-14,6.	240 - 260	4
14,6.-19,6.	260	0
19,6.-21,9.	260 - 280	15
21,9.-23,9.	280	0
23,9.-26,0.	140	- (Abkühlphase)
26,0.-29,0.	140	- (Äquilibrierungsphase)

-Injektortemperatur: 215°C
-Injektionsart: splitless
-Make up Gas: Stickstoff, Fluß: 30 ml/min
-FID- Bedingungen: Sauerstoff, Fluß: 300 ml/min
Wasserstoff, Fluß: 35 ml/min
-Detektortemperatur: 275°C

2.1.4.1. Derivatisation der Trichothecene

Die Derivatisation von Standardtoxinen und Probenextrakten erfolgte mit zwei Methoden:

- Derivatisation mit N-Methyl-bis-trifluoracetamid (MBTFA) (Pierce Chemical Company, Nr. 49701)

Standardtoxine (0,1 - 1,0 µg) bzw. Probenextrakte wurden in 50 µl MBTFA gelöst und danach für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde das Derivatisationsmittel vollständig unter Stickstoff abgedampft und die Probe erneut in 10 µl MBTFA gelöst. 1 µl wurde in den Gaschromatographen eingespritzt.

- Derivatisation mit Tri-Sil/TBT (Pierce Chemical Company, Nr. 49016)

50 µl Tri-Sil/TBT (N-Trimethylsilylimidozol (TMSI), N,O,-bis-Trimethylsilylacetamid (BSA) und Trimethylchlorosilan (TMCS) im Verhältnis 3:3:2, wurden zu Standardtoxinen bzw. Probenextrakten gegeben, 10 sec geschüttelt und dann bei 60°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Aqua dest. zugegeben, erneut geschütteln (10 sec) und von 10 µl Chloroform hinzugefügt; nach kräftigem Schütteln für 20 sec und Absetzenlassen der Chloroformphase wurde 1 µl der Chloroformfraktion in den Gaschromatographen injiziert.

2.1.4.2. Chromatogrammaufzeichnung und Chromatogrammauswertung

Die Chromatogrammaufzeichnung und Integration der Peaks erfolgte mit einem Mega Series Integrator der Firma Carlo Erba. Die Chromatogramme wurden mit einer Schreibergeschwindigkeit von 1 cm/min aufgezeichnet.

Durch Vergleich der Retentionszeiten der Toxinpeaks des Standardchromatogramms mit den Peaks der Probenchromatogramme erfolgte die Identifizierung der einzelnen Trichothecene. Chromatogramme von toxinfreien Kontrollproben wurden ebenfalls in den Vergleich einbezogen; darüber hinaus wurden zur Abklärung fraglicher Peaks Probenextrakte und Standardtoxine gleichzeitig chromatographiert (Coinjektion).

Die quantitative Berechnung der Toxinmengen erfolgte durch den Vergleich der vom Integrator ausgedruckten Peakcounts bzw. Peakhöhen der Proben mit den Peakcounts bzw. Peakhöhen eines unter gleichen Bedingungen erstellten definierten Toxinstandards.

Folgende Formel wurde für die Berechnung verwendet:

$$\text{Toxinmenge } (\mu\text{g/g}) = \frac{T \times P \times V \times F}{S \times I}$$

T = injizierte Toxinstandardmenge (μg)

P = Counts bzw. Höhe (mm) des Toxinpeaks der Probe

V = Gesamtvolumen des gelösten Probenextraktes (μl)

F = Verdünnungsfaktor des Probenextraktes (Quotient aus Gesamtprobenmenge (g) und Probenmenge (g) gelöst in V)

S = Counts bzw. Höhe (mm) des Toxinpeaks des Standards

I = Volumen der injizierten Probe (μl)

Die Wiederfindungsrate wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Wr} = \frac{T_g}{T_z} \times 100$$

Wr = Wiederfindungsrate (%)

T_g = errechnete Toxinmenge ($\mu\text{g/g}$ Probe)

T_z = zugesetzte Toxinmenge ($\mu\text{g/g}$ Probe)

2.1.4.3. Überprüfung der Linearität des Flammenionisationsdetektors (FID)

Der lineare Bereich und die Nachweisgrenze des Flammenionisationsdetektors wurden mit T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolanil und T-2 Tetraol bestimmt.

Nach der Derivatisation mit MBTFA bzw. Tri-Sil/TBT (vgl.2.1.4.1.) wurden folgende Toxinmengen (ng) injiziert: 5, 10, 20, 50, 100, 200; die Injektionsmenge betrug jeweils 1 µl.

2.1.5. Gas-Flüssig-Chromatographie - Massenspektrometrie (GC-MS)

Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit einem GC-MS System der Firma Finnigan durchgeführt (Finnigan Mat,Bremen, 1020).

Als Trennsäule kam eine 15 m lange Fused Silica Capillary Column, DB-5, SE-54, mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm (ICT Handelsgesellschaft, Nr. 122-5012) zum Einsatz.

Helium diente als Trägergas; der Trägergasdruck wurde auf 0,6 kg/cm eingestellt.

Temperaturprogramm:

Zeit (min)	Temperatur (°C)	Temperaturanstieg (°C/min)
0.- 3.	140	0
3.- 17.	140 - 240	10
17.- 27.	240 - 280	4

Injektortemperatur: 250°C

Injektionsart: splitless

Injektionsvolumen: 1 µl

Interfacetemperatur: 250°C

Die Derivatisierung der Trichothecene erfolgte wie unter 2.1.4.1. beschrieben.

Die Massenspektrometrie der Toxine wurde bei chemischer Ionisation in Methan (CI) vorgenommen.

Von den einzelnen Trichothecenstandards wurden komplette Spektren angefertigt; um eine höhere Nachweisempfindlichkeit zu erhalten, wurde Probenmaterial häufig mit einzelnen selektiven Ionen (SIM, Selected Ion Monitoring) registriert. Die Identifizierung der einzelnen Toxine erfolgte durch den Vergleich mit Standardtoxinen bezüglich der Retentionszeit, der charakteristischen Ionen und der relativen Intensität der entstandenen Ionen zueinander.

2.2. Versuche zur Optimierung der Analytik von Trichothecenen in einer biologischen Matrix

2.2.1. Extraktionsmittel

2.2.1.1. Ethylacetat

10 ml bzw. 10 g Probenmaterial wurden mit 50 ml Ethylacetat (Merck, Art.9623) für 30 min geschüttelt. Der Ethylacetatüberstand wurde - gegebenenfalls nach kurzem Zentrifugieren bei 0°C - quantitativ abpipettiert und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers vollständig eingengt (Scott et al., 1981).

2.2.1.2. Acetonitril

Zu 10 ml bzw. 10 g Probe wurden 2 mal 100 ml Acetonitril (Merck, Art.3) gegeben und 30 min geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch über einen Faltenfilter (Schleicher und Schüll, Nr. 311652) in einen Scheidetrichter filtriert.

2.2.1.3. Methanol

10 ml bzw. 10 g Probenmaterial wurden mit 20 ml Aqua dest. gemischt; die Extraktion der Trichothecene erfolgte durch 15 minütiges Schütteln mit 30 ml Methanol (Merck, Art.6012) (Romer et al., 1978).

2.2.2. Aufreinigungsverfahren

2.2.2.1. Flüssig-flüssig Trennung

- Acetonitril / Petroleumbenzin

Im Anschluß an die Extraktion mit Acetonitril (siehe 2.2.1.2.) wurde ein flüssig-flüssig Trennung vorgenommen; dazu wurde das Filtrat 2 mal mit 100 ml Petroleumbenzin (Merck, Art.1774) 15 min ausgeschüttelt. Die Acetonitrilphase wurde quantitativ gewonnen und vollständig mittels Rotationsverdampfer eingengt.

- Wasser-Methanol-Gemisch / Chloroform

Nach der Präzipitation von Proteinbestandteilen des Probenmaterials (siehe 2.2.2.2.) wurde das in einem Scheidetrichter aufgefangenen Filtrat mit 3 mal 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Danach wurden die vereinigten Chloroformphasen über wasserfreies gekörntes Natriumsulfat (Merck, Art.6639) getrocknet und mit dem Rotationsverdampfer vollständig eingengt.

2.2.2.2. Präzipitation

- Fällung mit Eisen-III-Chloridlösung

Zur Fällung von Farbkomplexen in Ethylacetatextrakten von Harnproben wurden diese in Anlehnung an STAHR et al.(1979) mit 5 ml einer 10 %igen Fe-III-Chloridlösung (Merck, Art.3943) (ph 4,6) behandelt. Das Gemisch wurde 15 min geschüttelt; anschließend wurde die Ethylacetatphase quantitativ gewonnen und mittels Rotationsverdampfer vollständig eingengt.

- Fällung mit Lead-acetat-Lösung

Ebenfalls zur Farbkomplexfällung diente die Lead acetat Lösung (GREGORY u. MANLEY, 1981) (200 g Bleiacetat (Merck, Art. 7375) in 1000 ml Aqua dest. gelöst und mit 3 ml Eisessig versetzt).

20 ml dieser Lead acetat solution wurden zu dem Ethylacetat-überstand (siehe 2.2.1.1.) gegeben; nach 15 minütigem Schütteln wurde die Ethylacetatphase quantitativ gewonnen und zur Gänze adgedampft.

- Fällung mit Ammoniumsulfatlösung

Als weiteres Präzipitationsmittel wurde eine 30 %ige Ammoniumsulfatlösung (Merck, Art.1217) verwendet (ROMER et al, 1978). 240 ml dieser Ammoniumsulfatlösung wurden zu dem Gemisch aus Probenmaterial (Harn), Aqua dest. und Methanol gegeben (siehe 2.2.2.3.); daraufhin wurde 30 sec. geschüttelt, 2 g Hyflo Super Cel (Serva, Art.25960) als Filtrierhilfe zugegeben und nach kurzzeitigem Schütteln über einen Faltenfilter in einen Scheidetrichter filtriert.

2.2.2.3. Säulenchromatographische Verfahren

2.2.2.3.1. Säulenchromatographie mit Kieselgel 60

Eine Glassäule von 300 mm Länge und einem Innendurchmesser von 10 mm wurde mit 0,5 g wasserfreiem Natriumsulfat, 15 ml Chloroform, 2 g Kieselgel 60, Korngröße 0,063 - 0,200 mm (Merck, Art. 7794) und zuletzt mit 0,5 g Natriumsulfat (wasserfrei) gefüllt; Luftblasen innerhalb des Kieselgels wurden durch Umrühren mit einem Glasstab vermieden. Der Probenextrakt wurde zusammen mit 10 ml Chloroform und 30 ml n-Hexan auf die Säule aufgebracht. Zum Spülen der Säule wurden 30 ml Toluol (Merck, Art.8325) und anschließend 40 ml Toluol / Aceton (38 + 2) verwendet. Trichothecene wurden mit 30 ml Diethylether, 40 ml Chloroform / Methanol (38,8 + 1,2) und 30 ml Aceton eluiert; das jeweilige Eluat wurde in 100 ml Rundkolben aufgefangen und vollständig mittels Rotationsverdampfer eingeeengt (ROMER et al., 1978).

2.2.2.3.2. Säulenchromatographie mit Florisil

Die mit 0,5 g Natriumsulfat, 1 g Florisil (Mesh 100-200 U.S.) (BDH Chemicals, Nr.15026) und zuletzt mit 0,5 g Natriumsulfat gefüllte Glaschromatographiesäule wurde in einem Chloroform / Methanolgemisch (95 + 5) gebaut und anschließend mit 10 ml n-Hexan gespült. Der in 4 ml Toluol gelöste Probenextrakt wurde auf die Säule, die danach mit 10 ml Dichlormethan (Merck, Art. 6650) gespült wurde, aufgebracht. Die Elution der Trichothecene erfolgte mit 10 ml Chloroform / Methanolgemisch (95 + 5) und weiteren 10 ml Chloroform / Methanolgemisch (50 +50). Das Eluat wurde in einem 50 ml Spitzkolben aufgefangen und mit Hilfe des Rotationsverdampfers vollständig eingeeengt. (In Anlehnung an SWANSON et al., 1982)

2.2.2.3.3. Säulenchromatographie mit XAD-Adsorberharz

Eine mit Aceton gefüllte Glaschromatographiesäule wurde mit 2 g XAD-Adsorberharz, Typ 2, Korngröße 0,1-0,2 mm (Serva, Art.42424) beschickt; etwas Glaswolle diente als obere und untere Säulengrenzung. Anschließend wurde mit 100 ml Aqua dest. gespült. 10 ml Probe (Harn) wurde entweder direkt auf die Chromatographiesäule aufgebracht, oder der Extrakt wurde vor dem Aufbringen auf die XAD-Säule in 10 ml eines Methanol / Aqua dest. Gemisches (1 + 19) gelöst. Nun wurde mit 100 ml Aqua dest. gespült und anschließend wurden die Trichothecene mit 100 ml einer 90 %igen Methanollösung eluiert. Vor dem Einengen in einem 250 ml Rundkolben mittels Rotationsverdampfer wurde das Eluat über 30 g gekörntes Natriumsulfat (wasserfrei) entwässert (MIROCHA et al., 1983).

2.2.2.3.4. Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche

Auf die mit 2 ml Methanol und 5 ml Aqua dest. aktivierte SEP-PAK C18 Kartusche (Waters Associates, Nr.51910) wurde der

in 2 ml 10 %igem Methanol gelöste Extrakt oder 10 ml Harn direkt aufgebracht. Die Kartusche wurde anschließend mit 2.25 ml 80 %igem Methanol eluiert.

2.2.2.3.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Aufreinigung von Extrakten wurde eine HPLC-Anlage der Firma Kontron, bestehend aus

- einem Programmiergerät (Modell 200),
- zwei Pumpen (LC Pump 410),
- einer Vorsäule (Länge: 30 mm; Innendurchmesser: 3 mm) gefüllt mit LiChrosorb RP 18, 10 µm Korngröße, (Merck, Art.9334) und
- einer Chromatographiesäule, 250 x 4 mm, gefüllt mit LiChrosorb RP 18, 10 µm Korngröße (Merck, Art.50334), verwendet.

Der Probenextrakt wurde jeweils in 120 µl 20 %igem Methanol (Merck, Art.6007) gelöst und über ein Rheodyne-Ventil auf die Chromatographiesäule aufgebracht.

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Fluß der mobilen Phase: 1 ml/min
- Mobile Phasen:
 - A) Methanol/Aqua dest. steril (20 + 80) (mit Helium entgast)
 - B) 100 %iges Methanol (mit Helium entgast)
- Eingesetztes Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Anteil der mobilen Phase B (%)
0.- 1.	0 %
1.-20.	kontinuierlicher Anstieg auf 100 %
20.-25.	100 %
25.-30.	kontinuierlicher Rückgang auf 0 %
30.-35.	0 % (Äquilibrierungsphase)

Das Eluat wurde in Minutenfraktionen (5.-22.Minuten) in 5 ml Schraubfläschchen aufgefangen, unter Stickstoff abgedampft und für Analysen mittels DC, GC-FID oder GC-MS bereitgestellt.

2.2.3. Anwendung dieser Verfahren zur Verbesserung der Analytik von Trichothecenen in Blutserum, Harn und Kot

2.2.3.1. Artifizielle Kontamination von Blutserum, Harn und Kot

Zu jeweils 10 ml bzw. 10 g Blutserum, Harn und Kot vom Schwein wurden nachstehende Toxine zugesetzt: T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolaniol und T-2 Tetraol.

Das Serum wurde mit jeweils 1,0 µg, 0,5 µg, 0,25 µg und 0,1 µg, der Harn mit 2,0 µg, 1,0 µg, 0,5 µg, 0,25 µg und 0,1 µg, und der Kot mit 4,0 µg, 2,0 µg, 1,0 µg, 0,5 µg, 0,25 µg und 0,1 µg der oben genannten Toxine artifiziiell kontaminiert.

Toxinfreie Proben von Blutserum, Harn und Kot wurden als Kontrolle mituntersucht.

2.2.3.2. Geprüfte Analysenmethoden zum Trichothecennachweis im Blutserum

Methode 1:

- Extraktion mit Ethylacetat (vgl. 2.2.1.1.)
- Säulenchromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche (vgl. 2.2.2.3.4.)
- Säulenchromatographie mit Florisil (vgl. 2.2.2.3.2.)
- GC-Analyse und Chromatogrammauswertung (vgl. 2.1.4.)

Methode 2:

- Extraktion mit Ethylacetat (vgl. 2.2.1.1.)
- Lösen des Extraktes mit 20 ml Methanol/Aqua dest. (1 + 19)
- Säulenchromatographie mit XAD-Adsorberharz (vgl. 2.2.2.3.3.)
- GC-Analyse und Chromatogrammauswertung (vgl. 2.1.4.)

2.2.3.3. Geprüfte Analysemethoden zum Trichothecennachweis im Harn

Bei allen Trichothecennachweisverfahren für Harn wurde im Anschluß an die im folgenden Kapitel beschriebenen Extraktions- und Aufreinigungsschritte ein Gas-Flüssig-Chromatographie-Flammenionisationsdetektion (vgl. 2.1.4.) durchgeführt.

Methode 1:

- Säulenchromatographie mit XAD-Adsorberharz (vgl. 2.2.2.3.3.)
- Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche (vgl. 2.2.2.3.4.)

Methode 2:

- Säulenchromatographie mit XAD-Adsorberharz (vgl. 2.2.2.3.3.)
- Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche (vgl. 2.2.2.3.4.)
- Säulenchromatographie mit Florisil (vgl. 2.2.2.3.2.)

Methode 3:

- Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche (vgl. 2.2.2.3.4.)
- Säulenchromatographie mit Florisil (vgl. 2.2.2.3.2.)

Methode 4:

- Extraktion mit Ethylacetat (vgl. 2.2.1.1.)
- Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche (vgl. 2.2.2.3.4.)
- Säulenchromatographie mit Florisil (vgl. 2.2.2.3.2.)

Methode 5:

- Extraktion mit Ethylacetat
(vgl. 2.2.1.1.)
- Säulenchromatographie mit Kieselgel 60
(vgl. 2.2.2.3.1.)

Methode 6:

- Extraktion mit Methanol
(vgl. 2.2.2.3.)
- Präzipitation mit Ammoniumsulfat
(vgl. 2.2.2.2.)
- Flüssig-flüssig Trennung
(vgl. 2.2.2.1.)
- Säulenchromatographie mit Kieselgel 60
(vgl. 2.2.2.3.1.)

Methode 7:

- Extraktion mit Ethylacetat
(vgl. 2.2.1.1.)
- Präzipitation von Farbkomplexen mit Eisen-III-Chloridlösung
(vgl. 2.2.2.2.)
- Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche
(vgl. 2.2.2.3.4.)
- Säulenchromatographie mit Florisil
(vgl. 2.2.2.3.2.)

Methode 8:

- Extraktion mit Ethylacetat
(vgl. 2.2.1.1.)
- Präzipitation von Farbkomplexen mit Lead-acetat-Lösung
(vgl. 2.2.2.2.)
- Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche
(vgl. 2.2.2.3.4.)
- Säulenchromatographie mit Florisil
(vgl. 2.2.2.3.2.)

Methode 9:

- Extraktion mit Ethylacetat
(vgl. 2.2.1.1.)
- Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche
(vgl. 2.2.2.3.4.)
- Säulenchromatographie mit Florisil
(vgl. 2.2.2.3.2.)
- HPLC-Aufreinigung
(vgl. 2.2.2.3.5.)

2.2.3.4. Geprüfte Analysenmethode zum Trichothecennachweis im
Kot

- Extraktion mit Acetonitril
(vgl. 2.2.1.2.)
- Flüssig-flüssig Trennung
(vgl. 2.2.2.1.)
- Chromatographie mit einer SEP-PAK C18 Kartusche
(vgl. 2.2.2.3.4.)
- Säulenchromatographie mit Florisil
(vgl. 2.2.2.3.2.)
- HPLC-Aufreinigung
(vgl. 2.2.2.3.5.)
- GC-Analyse und Chromatogrammauswertung
(vgl. 2.1.4.)

2.4. "In vivo" Versuche zum Metabolismus von Trichothecenen
im S-9 Leberüberstand von Schweinen

2.4.1. Herstellung des S-9 Leberüberstandes

Diese Untersuchungen wurden in Anlehnung an YOSHIZAWA et al.
(1984) in einem 0,25 molaren Sörensen-Puffer (ph 7,4) durchge-
führt. Um 100 ml dieser Pufferlösung zu erhalten, wurden 80,8
ml einer 0,25 molaren Dinatriumphosphatlösung (Merck, Art.6580)
und 19,2 ml einer 0,25 molaren Monokaliumphosphatlösung (Merck,
Art.4873) vermischt.

Unmittelbar nach der Schlachtung entnommene Schweineleber (50 g) wurden mit dem Na-Phosphat-Puffer (ph 7,4) gespült und mit 4 Volumenteilen dieser Pufferlösung mit Hilfe eines Handhomogenisators (Modell Eppendorf) im Eiswasserbad homogenisiert.

Das Leberhomogenat wurde bei 9000 G für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend über Glaswolle filtriert.

Zu 100 ml des so gewonnenen Filtrates wurden folgende Chemikalien ("NADPH-generating System") in nachstehender Menge gegeben:

- 0,1 mM NADP = 7,65 mg (ß-Nicotinamidadenin-Dinucleotid-Phosphat) (Sigma, N-0505)
- 1,0 mM D-Glucose-6-Phosphat = 26,01 mg (Sigma, G-9507)
- 1,6 mM (MgCl₂) x 6 H₂O = 32,52 mg (Merck, Art.5833)
- 6,6 mM KCl = 48,84 mg (Merck, Art.4933)

2.4.2. Artifizielle Kontamination des Leberreaktionsgemisches mit Trichothecen

Zu 20 ml des Leberreaktionsgemisches (vgl. 2.4.1.) wurden 2 mg T-2 Toxin = 4,28 µmol, oder 2 mg HT-2 Toxin = 4,71 µmol, oder 2 mg Neosolaniol = 5,23 µmol, oder 2 mg T-2 Tetraol = 6,70 µmol gegeben.

Anschließend erfolgte die Inkubation für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank.

2.4.3. Extraktion des S-9 Leberüberstandes

Nach Inkubation wurde das Leberreaktionsgemisch auf eine in Aceton gebaute, anschließend mit 100 ml Aqua dest. gespülte, XAD-Adsorberharz (1g) Chromatographiesäule aufgebracht. Die Säule wurde nun erneut mit 100 ml Aqua dest. gespült und an-

schließlich wurden die Trichothecene mit 150 ml Aceton von der Säule eluiert.

Das Eluat wurde nun mittels Rotationsverdampfer vollständig eingengt und mit Aceton quantitativ in 5 ml Reaktionsfläschchen überführt.

Anschließend wurde eine weitere Aufreinigung der Extrakte mit Hilfe der HPLC (vgl. 2.2.2.3.5.) durchgeführt.

2.4.4. Analyse der eingesetzten Trichothecene bzw. ihrer Metaboliten

Die nach der HPLC-Aufreinigung gewonnenen und unter Stickstoff abgedampften Extrakte wurden in Chloroform gelöst und 10 μ l ($\approx$ 500 mg Leber) auf eine DC-Platte aufgetropft. Die DC-Analyse wurde wie unter 2.1.3. beschrieben durchgeführt. Darüber hinaus wurden Aliquote der Extrakte mit der GC-FID (vgl. 2.1.4.) bzw. GC-MS (vgl. 2.1.5.) untersucht.

Toxinfreies Leberreaktionsgemisch wurde als Kontrolle in gleicher Weise, wie unter 2.4.3. und 2.4.4. beschrieben, extrahiert und analysiert.

2.5. Untersuchungen zur Wirkung und zum Metabolismus von T-2 Toxin beim Schwein

Dazu stand mir Untersuchungsmaterial eines Tierversuches zur Verfügung, der wie folgt durchgeführt worden war:

2.5.1. Haltung und Fütterung

Sowohl das Kontrolltier als auch die beiden Versuchstiere waren beim Einstellen in Einzelstoffwechselboxen als klinisch gesund befunden worden. Sie waren 2 x täglich mit 400 g und 300 g Zuchtsauenalleinfutter (BAYWA), das vor Versuchsbeginn mykotoxikologisch untersucht worden war und frei von Trichothecenen war, gefüttert worden. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Nach einer Eingewöhnungsphase von 2 Tagen war den Schweinen unter Narkose ein Venenverweilkatheder (ERU-Ernährungssonde, WILLY RÜSCH, Waiblingen, Kat.-Nr. 224100) in die Vena cava caudalis gelegt worden.

Die Thrombenbildung war 2 x täglich durch die Aspiration von 5 ml Blut, Injektion von 20 ml physiologischer Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9 %, BRAUN Melsungen) und anschließender Injektion von 2 ml Liquemin-Lösung (5000 I.E./500 ml physiologischer Kochsalzlösung) (Liquemin :HOFFMANN-LA ROCHE AG) verhindert worden.

2.5.2. Toxinapplikation

Zwei Läufer Schweinen war 4 Tage nach Legen des Venenkatheters kristallines, in einer magenlöslichen Gelatine kapsel (Capsulae operculatae 0,5 ccm, G. POHL-BOSKAMP) eingewogenes, T-2 Toxin, in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht, mittels Pilleneingeber verabreicht worden.

7 Tage nach oraler Toxinapplikation waren die Schweine mit 1 mg T-2 Toxin pro kg Körpergewicht intravenös belastet worden.

Kristallines T-2 Toxin (20 mg) war dazu in 2 ml Ethanol gelöst und über den Verweilkatheder den Schweinen injiziert worden. Anschließend spülte man den Katheder mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung. Dem Kontrolltier waren 2 ml reines Ethanol intravenös verabreicht worden.

Da kurzzeitig nach der Toxinapplikation neben Somnolenz, "hundesitziger Stellung" und über den ganzen Körper hinwegziehender Tremor auch mehrmaliges Erbrechen beobachtet worden war, war für die spätere Toxinanalyse auch Erbrochenes asserviert worden.

2.5.3. Probenentnahme und Probenaufbewahrung

Nach den Toxinapplikationen waren 7 Tage Proben von Blut, Harn und Kot nach folgendem Schema genommen worden:

Probe	Entnahmezeitpunkte in Stunden p. appl.
Blut	1/2, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168,
Harn	6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168,
Kot	6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168,

Erbrochenes war sofort nach dem Erbrechen gesammelt worden.

Nach jeder Blutentnahme war der Venenkatheder wie unter 2.5.1. beschrieben gespült worden.

Die Serumgewinnung erfolgte im Anschluß an die Blutentnahme durch Zentrifugation (1500 x g, 10 Minuten).

Harn und Kot waren in einer Wanne unter den Boxen aufgefangen worden. Harn, Kot und Erbrochenes waren getrennt quantifiziert und ein Aliquot von ca. 200 ml bzw. 500 g war als Probe entnommen worden.

Kotpartikel waren vom Harn durch Zentrifugieren (1500 x g, 10 Minuten) abgetrennt worden.

Die Probenaufbewahrung erfolgte bis zur Analyse bei - 20°C im Gefrierschrank.

2.5.4. Analyse der Proben

2.5.4.1. Analyse der Blutserumproben

Alle Blutserumproben wurden wie unter 2.2.3.2. Methode 1 beschrieben.

Die einzelnen Analysenschritte sind in Abbildung 3 nochmals schematisch dargestellt.

2.5.4.2. Analyse der Harnproben

Aufgrund der Ergebnisse der Versuche zur Optimierung der Analytik von Trichothecenen aus einer biologischen Matrix wurde das unter 2.2.3.3. Methode 9 beschriebenen Verfahren gewählt.

Abbildung 4 zeigt die einzelnen durchgeführten Analysenschritte.

2.5.4.3. Analyse der Kotproben

Die Kotproben wurden mit dem unter 2.2.3.4. aufgezeigten Analysenverfahren untersucht.

Abbildung 5 veranschaulicht dieses Untersuchungsverfahren.

2.5.4.4. Analyse des Erbrochenen

Erbrochenes wurde analog dem Kotprobenmaterial extrahiert, aufgereinigt und analysiert (vgl. 2.2.3.4. und Abbildung 5).

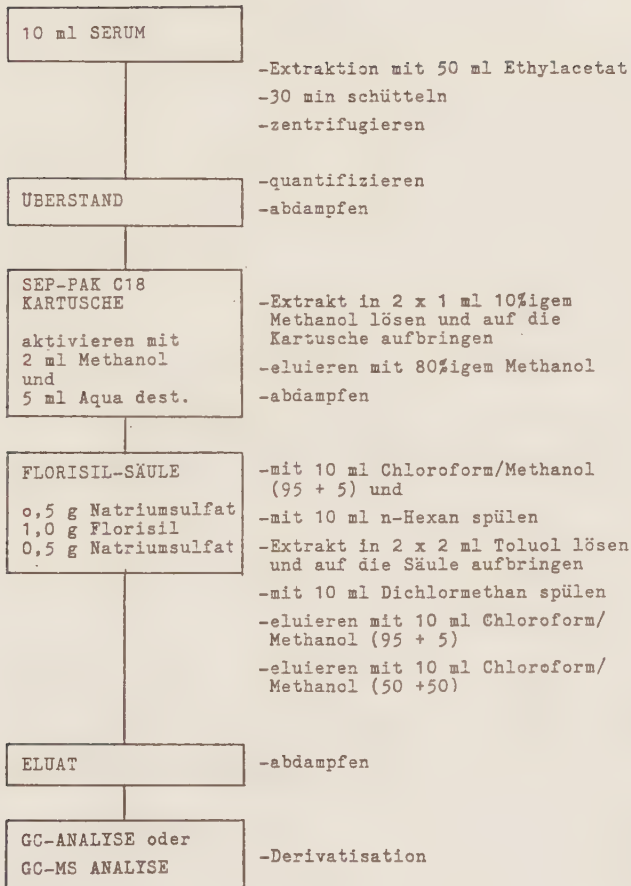


Abbildung 3 : Schematische Darstellung des Analysenverfahrens
zum Nachweis von Trichothecenen im Serum

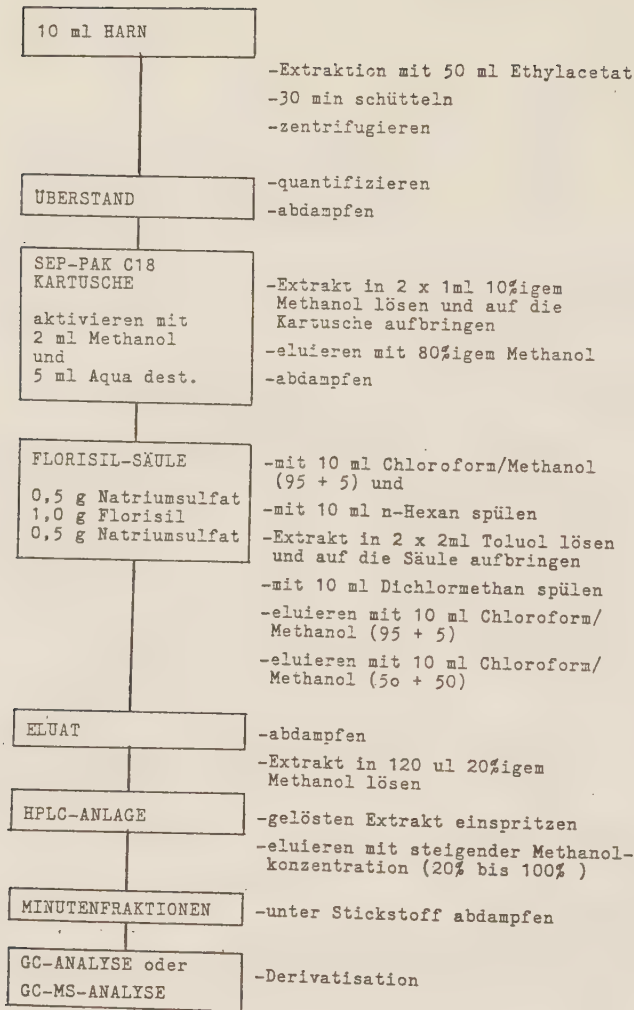


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von Trichothecenen im Harn

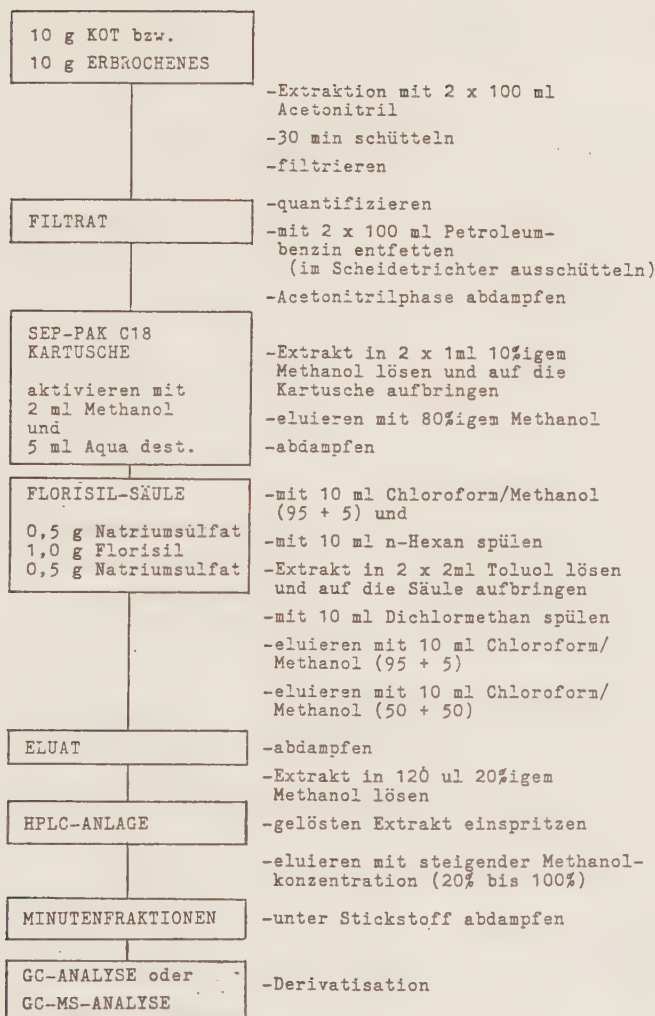


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von Trichothecenen im Kot und Erbrochenem

3. Ergebnisse und deren Besprechung

3.1. Ergebnisse der Untersuchungen zum gaschromatographischen Nachweis von Trichothecen

- Derivatisation der Trichothecene

Die unter 2.1.4.1. beschriebenen Methoden der Derivatbildung mit MBTFA und Tri-Sil/TBT waren gut durchführbar.

Einfache Handhabung und eine geringe Verschmutzung des Flammenionisationsdetektors durch Derivatisierungsmittelrückstände zeichnen beide Methoden der Derivatisation aus.

Die mit Tri-Sil/TBT silylierten Derivate der Trichothecene wurden jeweils später von der Kapillartrennsäule eluiert als die entsprechenden mit MBTFA acetylierten Trichothecenderivate. Tabelle 9 zeigt die bei gleichen GC-Bedingungen ermittelten unterschiedlichen Retentionszeiten für silylierte und acetylierte Trichothecenderivate.

Die acetylierten Derivate der Toxine waren bei Zimmertemperatur bis zu 6 Stunden beständig; danach setzte ein allmählicher Zerfall der Trichothecenderivate ein, so daß nach 24 Stunden nur noch 50 % der ursprünglich vorhandenen Konzentration meßbar war. Dagegen waren silylierte Trichothecene auch nach 48 Stunden noch vollständig derivatisiert.

Während sich, wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist, das mit Tri-Sil/TBT derivatisierte Neosolaniol als einheitlicher Toxinpeak darstellt, zeigt das acetylierte Neosolaniol drei deutliche Toxinpeaks.

Tabelle 9 : Retentionszeiten von T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolaniol und T-2 Tetraol nach Derivatisation mit MBTFA und Tri-Sil/TBT bei gleichen gaschromatographischen Bedingungen

Toxin	Retentionszeit des MBTFA-Derivates (min)	Retentionszeit des Tri-Sil/TBT-Derivates (min)
T-2 Tetraol	7,98	13,48
Neosolaniol	{ 9,48 9,59 10,45	14,50
T-2 Triol	10,34	15,91
HT-2 Toxin	11,64	17,12
T-2 Toxin	14,21	17,22

- Überprüfung der Linearität des FID

Die Ergebnisse der Überprüfung des Linearitätsbereiches des Flammenionisationsdetektors sind in Abbildung 6 und 7 dargestellt.

Wie daraus hervorgeht liegen die getesteten Toxinmengen (5 - 200 ng/Injektion) innerhalb des linearen Bereiches des FID.

Gleichzeitig ist ersichtlich, daß 5 ng des acetylierten bzw. silylierten T-2 Toxin-, HT-2 Toxin-, T-2 Triol-, Neosolaniol- und T-2 Tetraolstandards mit Hilfe des FID noch eindeutig nachweisbar ist.

Aus Abbildung 6 ist zu entnehmen ist, daß sich das mit MBTFA acetylierte HT-2 Toxin durch eine besonders intensive Detektorantwort pro injizierter Toxinmenge auszeichnet.

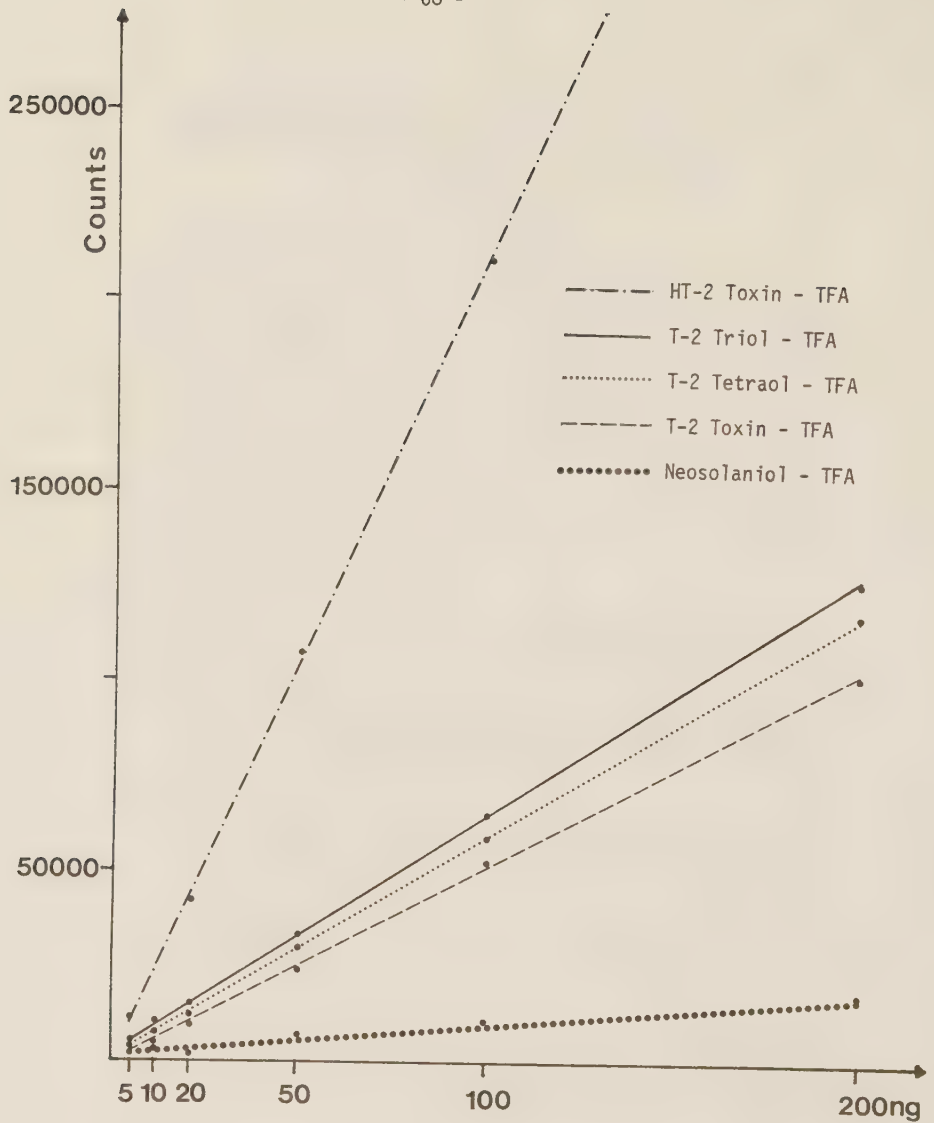


Abbildung 6 :

Standardkurve von T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Neosolaniol, T-2 Triol und T-2 Tetraol für den FID nach Derivatisation mit MBTFA.

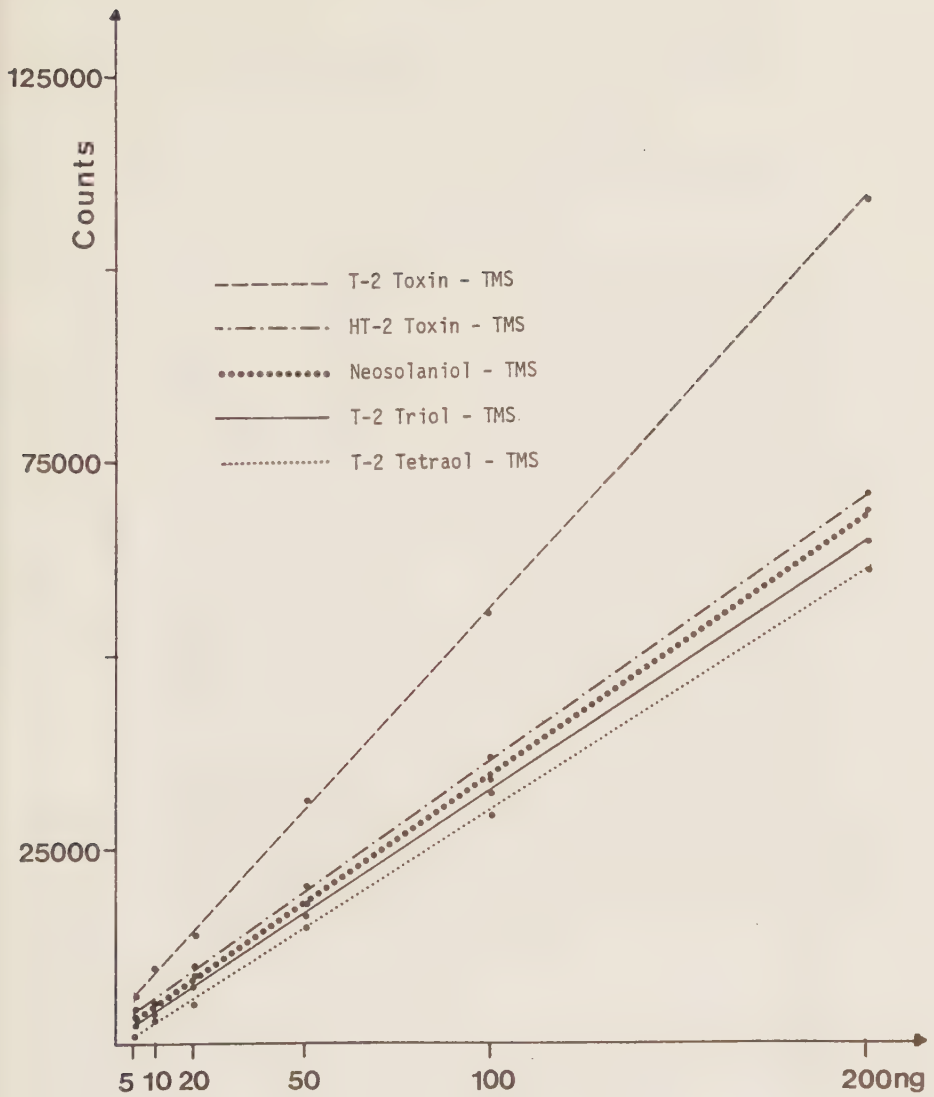


Abbildung 7 :

Standardkurve von T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Neosolaniol, T-2 Triol
und T-2 Tetraol für den FID nach DerivatISATION mit Tri-Sil/TBT.

3.2. Ergebnisse der Versuche zur Optimierung der Analytik von Trichothecenen in einer biologischen Matrix

3.2.1. Ergebnisse der Analysemethoden zum Trichothecennachweis im Blutserum

Die unter 2.2.3.2. Methode 1 beschriebene Analysemethode (Extraktion mit Ethylacetat, Aufreinigung mit einer SEP-PAK C18 Kartusche und einer Florisil-Chromatographiesäule) war der unter 2.2.3.2. Methode 2 beschriebenen (Extraktion des Serums mit Ethylacetat und Aufreinigung über eine XAD-Chromatographiesäule), bezüglich Verschmutzungsgrad des Extraktes, Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate der zugesetzten Trichothecene, überlegen. So traten bei der zuletzt genannten Extraktions- und Aufreinigungsmethode in den Chromatogrammen im Bereich der Toxinpeaks interferierende Substanzen auf, die die Auswertung dieser Chromatogramme erschwerten.

Die Nachweisgrenze für T-2 Toxin und HT-2 Toxin im Blutserum lag bei der Aufreinigungsmethode mittels XAD-Adsorberharz bei 200 ng/ ml Blutserum, während sie bei der Aufreinigungsmethode mittels SEP-PAK C18 Kartusche und Florisilsäule für diese beiden Trichothecene bei 10 ng/ ml Serum lag. Die genauen Zahlen der Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen, die für Trichothecene im Blutserum mit der unter 2.2.3.2. Methode 1 beschriebenen und in Abbildung 3 schematisch dargestellten Analyse-methode gefunden wurden, sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10 :

Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate von Trichothecenen im Blutserum von Schweinen
(Analysenverfahren siehe: 2.2.3.2. Methode 1)

Trichothecene	Nachweisgrenze (ng/ml)	*Wiederfindungsraten (w) in % bei einer zugesetzten Toxinnmenge von			
		100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	10 ng/ml
T-2 Toxin	10	85,3	85,0	44,0	23,5
HT-2 Toxin	10	103,0	89	32,6	21,6
Neosolaniol	25	57,2	23,3	17,6	0,0
T-2 Triol	10	82,8	32,6	35,6	10,5
T-2 Tetraol	100	3,2	0,0	0,0	0,0

* Durchschnittswert von jeweils 2 Analysen

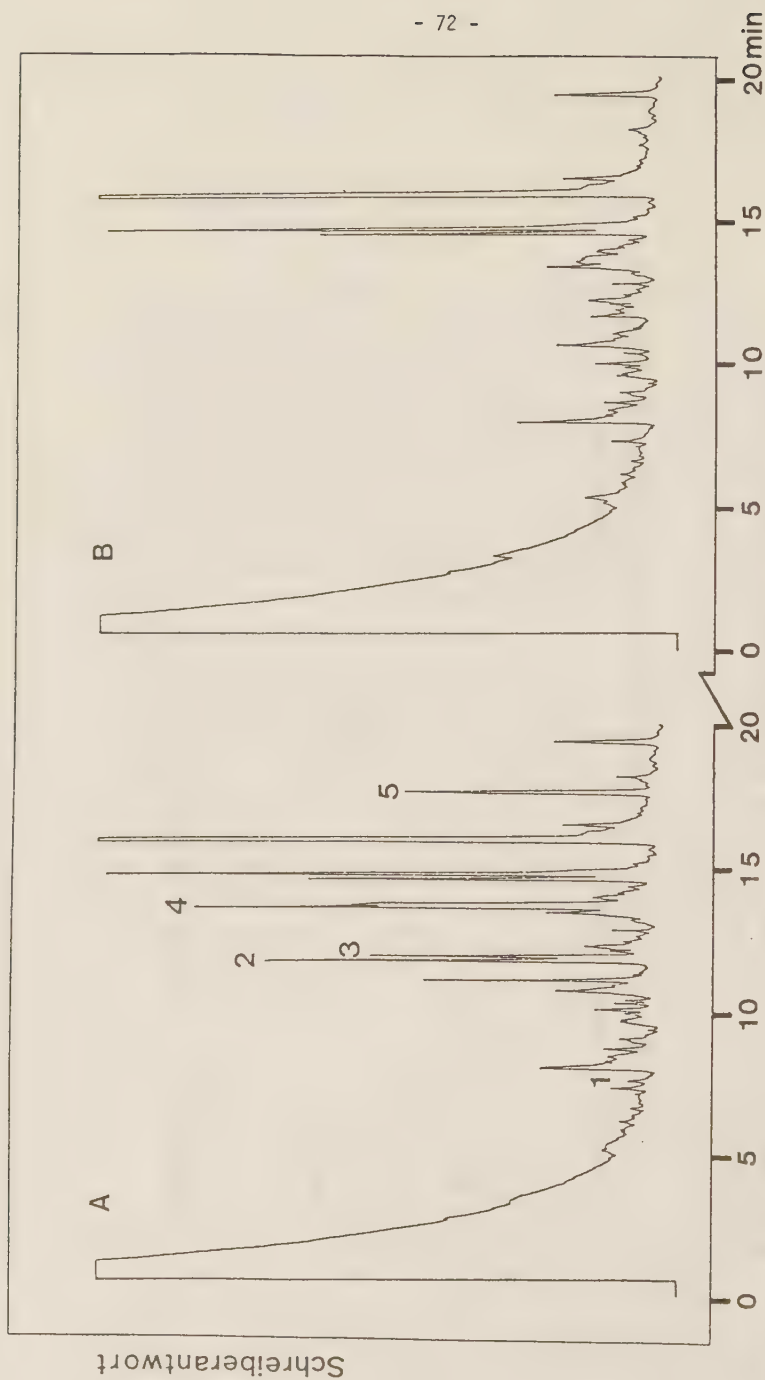


Abbildung 8 :

Chromatogramme (A) einer mit je 100 ng/ml T-2 Tetraol (1), T-2 Triol (2), Neosolaniol (3), HT-2 Toxin (4) und T-2 Toxin kontaminierten Blutserumprobe und (B) einer nicht kontaminierten Blutserumprobe. (Injektionsvolumen $\hat{=}$ 0,94 ml Blutserum)

3.2.2. Ergebnisse der HPLC-Trennung von Standardtoxinen

Mit dem unter 2.2.2.3.5. beschriebenen HPLC-Trennverfahren wurde für T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, T-2 Tetraol, Neosolaniol folgendes Elutionsprofil festgestellt:

Im Eluat enthaltenes Trichothecen Minutenfraktion

T-2 Tetraol	7, 8, 9
Neosolaniol	12, 13
T-2 Triol	17, 18
HT-2 Toxin	19
T-2 Toxin	20

3.2.3. Ergebnisse der Analysemethoden zum Trichothecennachweis in Harn

Um einen für die Gas-Flüssig-Chromatographie interferenzfreien Harnextrakt zu erhalten, wurden die unter 2.2.3.3. beschriebenen Nachweismethoden für Trichothecene getestet. Mit Ausnahme der Extrakte, die zusätzlich über eine HPLC-Chromatographiesäule aufgereinigt wurden (vgl. 2.2.3.3. Methode 9), wiesen alle Harnextrakte (vgl. 2.2.3.3. Methode 1 - 8) einen so hohen Verschmutzungsgrad auf, daß eine zuverlässige Auswertung der Chromatogramme unmöglich war; interferierende Substanzen traten im Bereich aller zum Harn zugesetzten Trichothecene auf.

Auf Grund der starken Verschmutzung dieser Harnextrakte war eine Reinigung des Injektors bzw. Detektors des Gaschromatographen nach ca. jeder 5 Injektion notwendig.

Da in der Literatur HT-2 Toxin als ein Hauptmetabolit des T-2 Toxins beschrieben wird (OHTA et al., 1977), wurde dieses Toxin als "Leittoxin" bei der Beurteilung der einzelnen Analysemethoden für Trichothecene im Harn ausgewählt. Die Nachweisgrenzen und die Chromatogrammauswertbarkeit der einzelnen getesteten Analysemethoden für das HT-2 Toxin sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Nachweisgrenzen und Chromatogrammauswertbarkeit für HT-2 Toxin im Harn bei verschiedenen Analyseverfahren

Analyse-methode (vgl. 2.2.3.3.)	Nachweisgrenze für HT-2 Toxin	Chromatogramm- auswertung
Methode 1	50 ng/ml	+/-
Methode 2	50 ng/ml	+/-
Methode 3	100 ng/ml	+/-
Methode 4	25 ng/ml	+/-
Methode 5	unbekannt	-
Methode 6	unbekannt	-
Methode 7	unbekannt	-
Methode 8	25 ng/ml	+/-
Methode 9	10 ng/ml	+

+ : Chromatogrammauswertung möglich

+/-: Chromatogrammauswertung erschwert (Interferenzen)

- : Chromatogrammauswertung unmöglich

Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, konnten mit der Analyse-methode 9 noch 10 ng HT-2 Toxin pro ml Harn nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren die Extrakte durch die HPLC-Aufreinigung von großer Reinheit, so daß eine eindeutige Auswertung der GC-Chromatogramme möglich war.

Auf Grund der guten Nachweisgrenze für HT-2 Toxin und der weitgehenden Interferenzfreiheit der Extrakte wurde die unter 2.2.3.3. Methode 9 beschriebene und in Abbildung 4 schematisch dargestellte Analyse-methode zum Trichothecennachweis in Harnproben gewählt.

Genaue Angaben über Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen dieser Analyse-methode (2.2.3.3. Methode 9) sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12 :

Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten von Trichothecenen im Harn von Schweinen
(Analysenverfahren siehe: 2.2.3.3. Methode 9)

Trichothecene	Nachweisgrenze (ng/ml)	*Wiederfindungsraten (w) in % bei einer zugesetzten Toxinmenge				
		200 ng/ml	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	10 ng/ml
T-2 Toxin	10	97,0	87,1	34,0	23,5	17,0
HT-2 Toxin	10	109,0	93,0	86,0	43,0	24,0
Neosolaniol	25	79,6	77,0	46,6	21,3	0,0
T-2 Triol	25	75,0	78,0	55,9	28,5	0,0
T-2 Tetraol	25	19,0	14,0	6,3	3,0	0,0

* Durchschnittswert von 2 Analysen

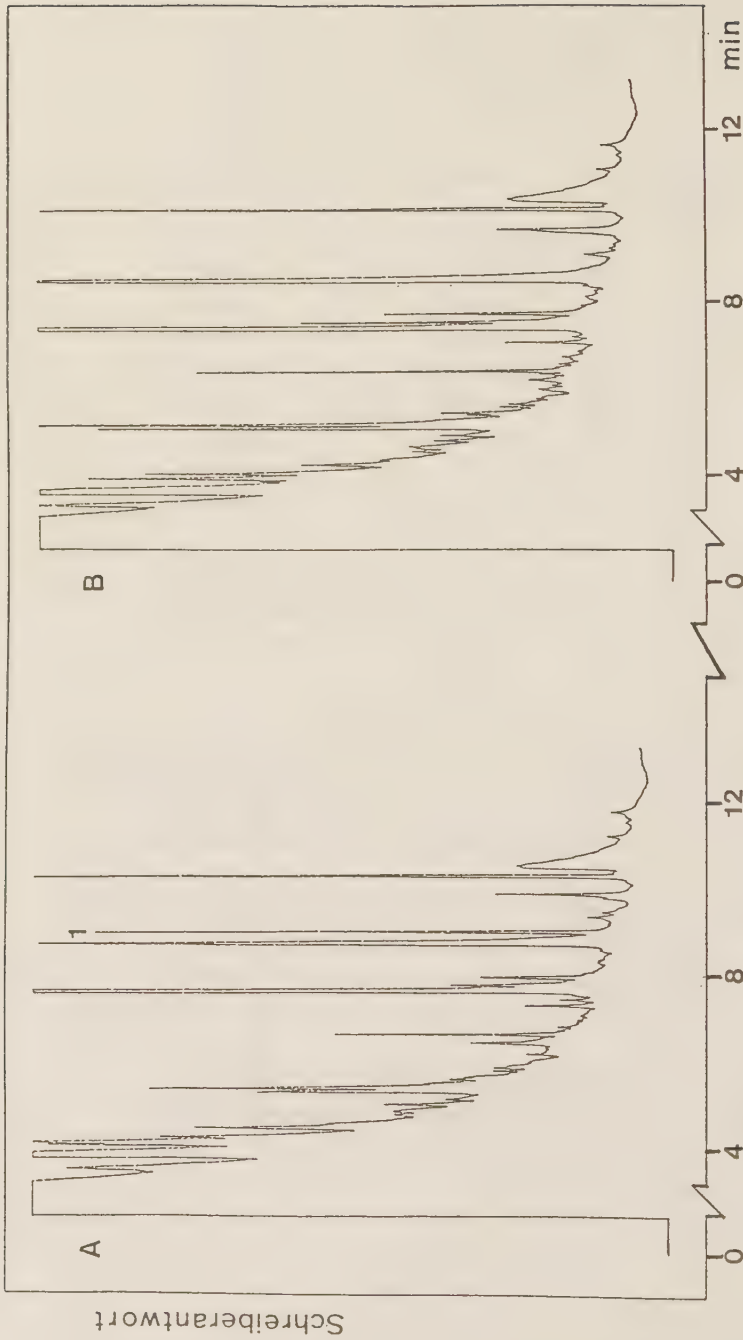


Abbildung 9 :

Chromatogramme der über HPLC gewonnenen 19. Minutenfraktion; A: Harnprobe kontaminiert mit 50 ng/ml HT-2 Toxin (1);
B: Harnprobe toxinfrei (Injektionsvolumen $\hat{=}$ 0,9 ml Harn)

3.2.4. Ergebnisse Analysenmethode zum Trichothecennachweis im Kot

Auf Grund der Ergebnisse, die bei den Versuchen zur Verbesserung der Trichothecenanalytik im Harn mit dem Einsatz der HPLC zur Aufreinigung von Extrakten gewonnen wurden (weitgehend verschmutzungsfreie Extrakte), wurde die HPLC auch zur Aufreinigung der Kotextrakte verwendet.

Die unter 2.2.3.4. beschriebene und in Abbildung 5 dargestellte Analysenmethode für Trichothecene im Kot erbrachte Chromatogramme, die im Bereich der Retentionszeit der eingesetzten Toxine weitgehend interferenzfrei waren.

HT-2 Toxin und T-2 Toxin konnten bis zu einer Menge von 10 ng/g Kot nachgewiesen werden.

Die Identifizierung und Quantifizierung von T-2 Triol bei einer Konzentration unter 50 ng/ g Kot war auf Grund einer Störsubstanzüberlagerung nicht mehr eindeutig möglich.

Die Nachweisgrenze für das polare T-2 Tetraol lag bei 200 ng/g Kot.

Die genauen Werte der Nachweisgrenzen sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Tabelle 13 :

Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten von Trichothecenen im Kot von Schweinen
(Analysenverfahren siehe: 2.2.3.4.)

Trichothecene	Nachweisgrenze (ng/g)	** Wiederfindungsraten (w) in % bei einer zugesetzten Toxinmenge					
		400 ng/g	200 ng/g	100 ng/g	50 ng/g	25 ng/g	10 ng/g
T-2 Toxin	10	87,9	97,0	63,8	34,0	33,4	5,6
HT-2 Toxin	10	94,0	103,0	74,8	74,5	69,0	16,6
Neosolaniol	100	37,0	32,0	19,2	0,0	0,0	0,0
T-2 Triol	100	46,0	31,9	28,5	0,0*	0,0*	0,0*
T-2 Tetraol	200	2,9	2,3	0,0	0,0*	0,0*	0,0*

* Interferenzüberlagerung

** Durchschnittswert von 2 Analysen

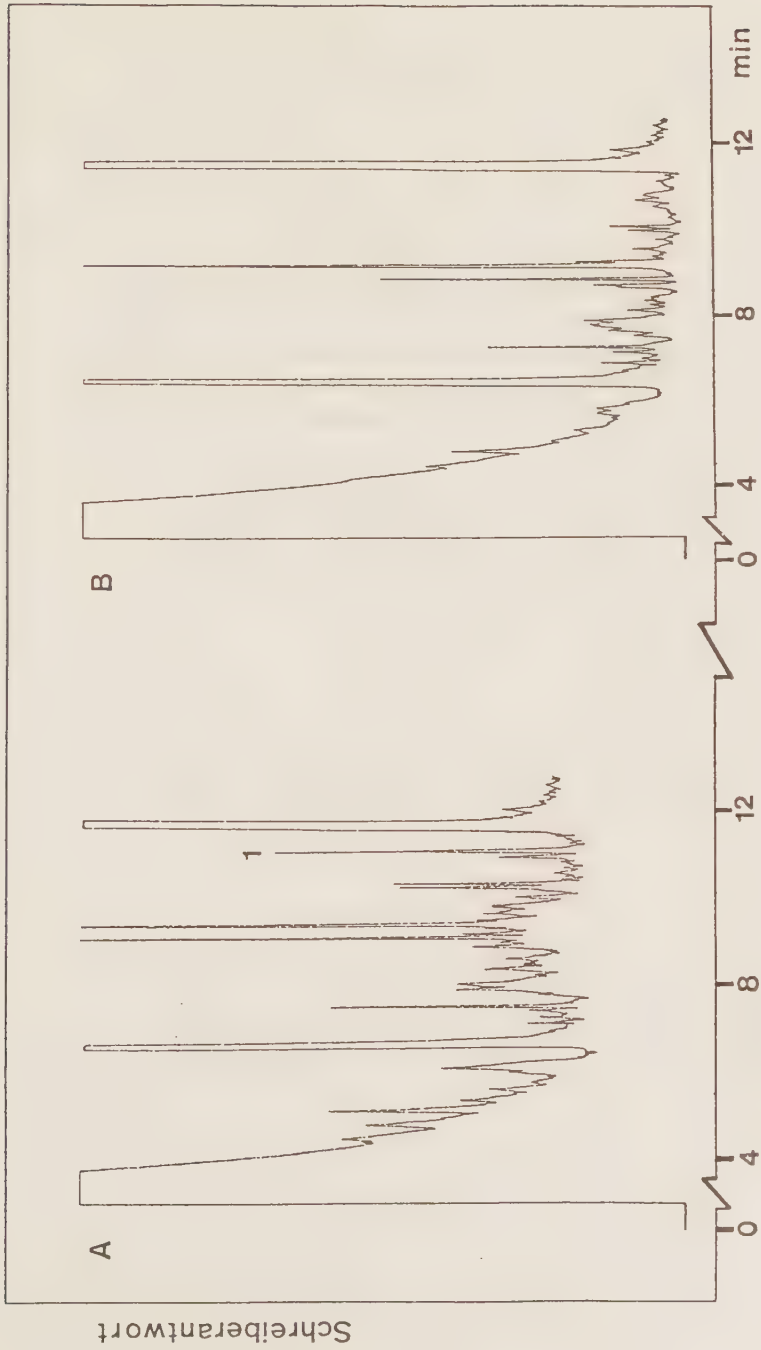


Abbildung 10 :

Chromatogramme der über HPLC gewonnenen 19. Minutenfraktion; A: Kotprobe kontaminiert mit 50 ng/g HT-2Toxin (1);

B: Kotprobe toxinfrei (Injektionsvolumen $\hat{=}$ 0,9 g Kot)

3.3. Ergebnisse der "in vitro" Versuche zum Metabolismus von Trichothecenem im S-9 Leberüberstand von Schweinen

- T-2 Toxin

Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme ergab, daß T-2 Toxin in den S-9 Leberüberständen innerhalb von 2 Stunden vollständig abgebaut worden war. Darüber hinaus konnten 4 Spots unterschiedlicher Intensität festgestellt werden, die in den toxinfreien Leberextrakten nicht vorhanden waren. Eine Substanz verhielt sich auf der DC-Platte wie HT-2 Toxinstandard; dieses Ergebnis wurde über die GC-MS Analyse bestätigt.

Des weiteren konnten zwei Spots mit Hilfe der GC-MS als 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin (Anteil semiquantitativ: 10 %) und 3'-Hydroxy-T-2 Toxin (Anteil semiquantitativ: 5 %) erkannt werden (vgl. Tabelle 14). Die Identifizierung einer weiteren Substanz, deren Rf-Wert zwischen T-2 Tetraol und T-2 Triol liegt, steht bislang noch aus.

- HT-2 Toxin

Wurde dem Leberreaktionsgemischgesetzte HT-2 Toxin zugesetzt, so wurde als einziger Metabolit 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin (Anteil semiquantitativ: 10%) detektiert (vgl. Tabelle 14).

- Neosolaniol

Zwei unbekannte Substanzen SN1 und SN2 (Anteil semiquantitativ: 10 bzw. 5 %) und T-2 Tetraol (Anteil semiquantitativ: 5 %) konnten nach Zugabe von Neosolaniol zu dem Leberreaktionsgemisch mittels Dünnschichtchromatographie analysiert werden.

- T-2 Tetraol

Bei der Verwendung von T-2 Tetraol konnten mittels DC, GC-FID und GC-MS keine Metaboliten festgestellt werden (vgl. Tabelle: 14).

Kontrollversuche bei denen Toxin (T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Neosolaniol oder T-2 Tetraol) zusammen mit dem " NADPH-generating System" (NADP, Glucose-6-Phosphat, Magnesiumchlorid und Kaliumchlorid) in einer Na-Phosphat-Pufferlösung (ph 7,4) ohne S-9 Leberüberstand inkubiert wurde (vgl. 2.4.2.), erbrachten keine Verstoffwechselung der zugesetzten Toxine.

Tabelle 14: Dünnschichtchromatographische Ergebnisse zum " in vitro" Metabolismus von T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Neosolaniol und T-2 Tetraol im S-9 Leberüberstand von Schweinen

EINGESETZTES TOXIN	ANALYSIERTE METABOLITEN	ANTEIL (semi- quantitativ in %)
T-2 Toxin	3'-Hydroxy-HT-2 Toxin	10
	HT-2 Toxin	80
	3'-Hydroxy-T-2 Toxin	5
	ST 1	5
HT-2 Toxin	HT-2 Toxin	90
	3'-Hydroxy-HT-2 Toxin	10
T-2 Tetraol	T-2 Tetraol	100
Neosolaniol	Neosolaniol	80
	SN 1	10
	SN 2	5
	T-2 Tetraol	5

ST 1, SN 1, SN 2 : nicht näher identifizierte Metaboliten

3.4. Ergebnisse der Untersuchungen zum T-2 Toxin Metabolismus beim Schwein

3.4.1. Ergebnisse der Analyse von Blutserum, Harn, Kot und Erbrochenem von Schweinen nach oraler Belastung mit T-2 Toxin

- Blutserum

In den von beiden Schweinen nach oraler T-2 Toxin-Applikation von je 2 mg/kg KGW gewonnenen Blutseren (vgl. 2.5.3.) konnte weder T-2 Toxin, noch eines seiner Stoffwechselprodukte (HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolaniol, T-2 Tetraol, 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin und 3'-Hydroxy-T-2 Toxin) über einen Beobachtungszeitraum von 96 Stunden nachgewiesen werden.

- Harn

Im Harn von Schwein No.1 konnte nach oraler Applikation von 2 mg T-2 Toxin/kg KGW HT-2 Toxin, T-2 Triol und 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin festgestellt werden (vgl. Tabelle 15). T-2 Toxin und die Metaboliten HT-2 Toxin, T-2 Triol und 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin konnten bereits innerhalb der ersten 6 Stunden nach Toxin-applikation im Harn analysiert werden. Während eine T-2 Toxin-Ausscheidung in den folgenden Stunden nicht mehr nachweisbar war, konnte eine über 72 Stunden anhaltende, allmählich absinkende HT-2 Toxin-Konzentration im Harn festgestellt werden. T-2 Triol und 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin wurden in der 24 - 48 Stunden Sammelprobe detektiert.

Von Schwein No.2 konnten nur die Harnproben ab dem 2. Versuchstag analysiert werden. Während in der 24 - 48 h Sammelprobe HT-2 Toxin (29,6 ug), 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin (15,8 ug) und T-2 Triol (10,8 ug) analysiert werden konnten, wurde am 3. Versuchstag nur noch HT-2 Toxin in einer Menge von 11,9 ug ausgeschieden; in später gesammelten Harnproben konnten keine T-2 Toxin-Metaboliten festgestellt werden.

Tabelle 15:

Ausscheidung von T-2 Toxin-Metaboliten im Harn von Schwein No. 1 nach oraler Applikation von T-2 Toxin (2.0 mg/kg KGW).

Zeitintervall der Sammelprobe (h)	T-2 Toxin		HT-2 Toxin		T-2 Triol		3'Hydroxy HT-2 Toxin	
	ng/ml	µg	ng/ml	µg	ng/ml	µg	ng/ml	µg
0 - 6	29	2.0	589	41.2	58	4.1	284	19.0
6 - 12	0	0.0	55	6.9	37	4.6	64	8.0
12 - 24	0	0.0	193	88.8	29	13.3	80	36.0
24 - 48	0	0.0	122	92.7	59	44.8	241	183.2
48 - 72	0	0.0	33	37.0	0	0.0	0	0.0
72 - 96	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
96 - 168	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

- Kot

Im Schweinkot konnte als einziger Metabolit HT-2 Toxin während der ersten 6 (Schwein No.1) bzw. 24 Stunden (Schwein No.2) nach oraler T-2 Toxinapplikation (2 mg/kg KGW) analysiert werden. Die quantitativen Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefaßt.

- Erbrochenes

Schwein No.1

In dem nach mehrmaligem Erbrechen gesammelten 296 g Erbrochenem konnten 4,650 mg T-2 Toxin analysiert werden; HT-2 Toxin oder andere T-2 Toxin-Metaboliten wurden nicht nachgewiesen.

Schwein No.2

Insgesamt wurden 3,590 mg T-2 Toxin und 0,090 mg HT-2 Toxin in dem Erbrochenem analysiert; davon wurden 1,790 mg T-2 Toxin in dem nach 1 Stunde und 50 Minuten Erbrochenem (95 g) und 1,800 mg T-2 Toxin und 0,090 mg HT-2 Toxin in dem in den folgenden 2 Stunden Erbrochenem (137 g) gefunden.

Tabelle 16 : Ausscheidung von HT-2 Toxin im Kot von zwei Schweinen nach oraler Applikation von T-2 Toxin (2.0 mg/kg KGW)

Zeitintervall der Sammelprobe (h)	S c h w e i n 1		S c h w e i n 2	
	ng/g	µg	ng/g	µg
0 - 6	238	14.7	54	4.1
6 - 12	-*	-*	0**	0.0
12 - 24	271	88.4	0	0.0
24 - 48	0	0.0	0	0.0
48 - 168	0	0.0	0	0.0

* diese Probe konnte aus technischen Gründen nicht analysiert werden

** in diesem Zeitintervall kein Kotabsatz

3.4.2. Ergebnisse der Analyse von Blutserum, Harn und Kot von Schweinen nach intravenöser Belastung mit T-2 Toxin

- Blutserum

Nach intravenöser Injektion von T-2 Toxin in einer Dosis von 1,0 mg/ KGW konnten in den Schweineblutseren sowohl T-2 Toxin und HT-2 Toxin mittels GC-FID, als auch T-2 Tetraol mittels GC-MS nachgewiesen werden.

Bereits 2 Stunden (Schwein No.1) bzw. 12 Stunden (Schwein No.2) nach der intravenösen Toxinapplikation war T-2 Toxin im Blut nicht mehr nachweisbar.

HT-2 Toxin konnte bis zu 6 Stunden nach T-2 Toxininjektion in den Blutseren beider Schweine detektiert werden; die höchste Konzentration von HT-2 Toxin wurde eine halbe Stunde nach der Toxingabe gemessen.

In Tabelle 17 sind die quantitativen Ergebnisse der Blutserum-analyse zusammengefaßt.

- Harn

Im Harn der beiden Schweine konnten folgende Metaboliten analysiert werden: HT-2 Toxin, T-2 Triol, T-2 Tetraol, 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin, 3'-Hydroxy-T-2 Toxin und 4-Deacetylneosalinol. HT-2 Toxin wurde als Hauptausscheidungsprodukt diagnostiziert, gefolgt 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin und 3'-Hydroxy-T-2 Toxin; T-2 Triol und insbesondere T-2 Tetraol konnten im Harn nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. In der 0 - 6 h Sammelprobe konnte als weiteres Ausscheidungsprodukt bei Schwein No.2 4-Deacetylneosalinol detektiert werden.

Während bei Schwein No.2 T-2 Tetraol nur innerhalb der ersten 6 Stunden gefunden wurde, konnte eine T-2 Triol-, 3'-Hydroxy-T-2 Toxin- und 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin-Ausscheidung bis zu 72 Stunden nach T-2 Toxin-Applikation beobachtet werden.

Im Harn von Schwein No.1 wurde am 3. Tag nach der T-2 Toxin-Injektion noch meßbare Mengen von HT-2 Toxin und 3'-Hydroxy-T-2 Toxin ausgeschieden (vgl. Tabelle 18 und Tabelle 19).

Tabelle 17: T-2 Toxin und HT-2 Toxin Konzentrationen im Blutserum von Schweinen (n=2) nach i.v. Injektion von T-2 Toxin (1.0 mg/kg KGW).

Zeit nach T-2 Toxin Applikation (h)	Schwein No. 1		Schwein No. 2	
	T-2 Toxin (ng/ml)	HT-2 Toxin (ng/ml)	T-2 Toxin (ng/ml)	HT-2 Toxin (ng/ml)
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	317.4	13.3	299.4	14.9
1.0	203.9	8.3	158.5	7.6
2.0	0.0	2.0	70.4	4.4
4.0	0.0	2.0	88.1	5.8
6.0	0.0	1.2	17.6	1.2
12.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24.0 - 96.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Tabelle 18:

Ausscheidung von T-2 Toxin-Metaboliten im Harn von Schwein No. 1 nach intravenöser Applikation von T-2 Toxin (1 mg/kg KGW).

Zeitintervall der Sammelprobe (h)	HT-2 Toxin		T-2 Triol		T-2 Tetraol		3'-OH-T-2*		3'-OH-HT-2**	
	ng/ml	µg	ng/ml	µg	ng/ml	µg	ng/ml	µg	ng/ml	µg
0 - 6	2484	124.2	24	1.2	0	0.0	308	15.4	674	33.7
6 - 12	913	146.0	9	1.4	0	0.0	245	39.2	94	15.0
12 - 24	139	34.8	58	14.5	0	0.0	58	14.5	79	19.8
24 - 48***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 - 72	47	9.8	0	0.0	0	0.0	40	8.4	0	0.0
72 - 96	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
96 - 168	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

* 3'-OH-T-2: 3'-Hydroxy-T-2 Toxin

** 3'-OH-HT-2: 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin

*** diese Probe konnte aus technischen Gründen nicht analysiert werden

Tabelle 19:

Ausscheidung von T-2 Toxin-Metaboliten im Harn von Schwein No. 2 nach intravenöser Applikation von T-2 Toxin (1 mg/kg KGW).

Zeitintervall der Sammelprobe (h)	HT-2 Toxin		T-2 Triol		T-2 Tetraol		3'-OH-T-2*		3'-OH-HT-2**	
	ng/ml	µg	ng/ml	µg	ng/ml	µg	ng/ml	µg	ng/ml	µg
0 - 6	6363	254.5	23	0.9	8	0.3	450	18.0	652	26.1
6 - 12	1625	178.8	0	0.0	0	0.0	2229	245.1	144	15.8
12 - 24	447	71.5	37	5.9	0	0.0	259	41.4	75	12.0
24 - 48***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 - 72	0	0.0	29	9.9	0	0.0	131	44.5	47	16.0
72 - 96	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
96 - 168	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

* 3'-OH-T-2: 3'-Hydroxy-T-2 Toxin

** 3'-OH-HT-2: 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin

*** diese Probe konnte aus technischen Gründen nicht analysiert werden

- Kot

Nach Injektion von T-2 Toxin (1 mg/ kg KGW) konnte im Kot der beiden Schweine HT-2 Toxin, T-2 Triol und 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 20 und Tabelle 21).

Die höchsten Konzentrationen dieser Trichothecene wurden in den ersten 6 Stunden nach Toxininjektion gemessen. HT-2 Toxin konnte noch nach 48 - 72 Stunden, T-2 Triol nach 12 - 24 Stunden (Schwein No.2) bzw. 48 - 72 Stunden (Schwein No.1) und 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin nach 12 - 24 Stunden analysiert werden.

Tabelle 20 :

Ausscheidung von T-2 Toxin-Metaboliten im Kot von Schwein No. 1 nach intravenöser Applikation von T-2 Toxin (1.0 mg/kg KGW)

Zeitintervall der Sammelprobe (h)	HT-2 Toxin		T-2 Triol		3'Hydroxy HT-2 Toxin	
	ng/g	µg	ng/g	µg	ng/g	µg
0 - 6	1942	696.0	643	230.5	2064	739.7
6 - 12*	0	0.0	0	0.0	0	0.0
12 - 24	771	30.2	409	16.0	150	5.9
24 - 48**	-	-	-	-	-	-
48 - 72	215	74.4	60	20.8	0	0.0
72 - 96	0	0.0	0	0.0	0	0.0
96 - 168	0	0.0	0	0.0	0	0.0

* in diesem Zeitintervall kein Kotabsatz

** diese Probe konnte aus technischen Gründen nicht analysiert werden

Tabelle 21 :

Ausscheidung von T-2 Toxin Metaboliten im Kot von Schwein No. 2 nach intravenöser Applikation von T-2 Toxin (1.0 mg/kg KGW)

Zeitintervall der Sammelprobe (h)	HT-2 Toxin		T-2 Triol		3'-Hydroxy HT-2 Toxin	
	ng/g	µg	ng/g	µg	ng/g	µg
0 - 6	2474	544.3	76	16.7	219	48.2
6 - 12*	0	0.0	0	0.0	0	0.0
12 - 24	218	14.5	45	3.0	32	2.1
24 - 48**	-	-	-	-	-	-
48 - 72	17	5.5	0	0.0	0	0.0
72 - 96	0	0.0	0	0.0	0	0.0
96 - 168	0	0.0	0	0.0	0	0.0

* in diesem Zeitintervall kein Kotabsatz

** diese Probe konnte aus technischen Gründen nicht untersucht werden

D) Diskussion

Für den Nachweis von Trichothecen in Körperflüssigkeiten, Exkreten und Organen sind nach Angaben in der Literatur die Gas-Flüssig-Chromatographie in Verbindung mit einem Flammenionisationsdetektor (YOSHIZAWA et al., 1980a), einem Elektro-neneinfangdetektor (SWANSON et al., 1982) oder einem Massenspektrometer (MIROCHA et al., 1981) einsetzbar.

Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, daß die Wahl des Derivatisierungsmittels für die Nachweisempfindlichkeit des jeweiligen Trichothecens von großer Bedeutung ist; während sich mit MBTFA acetyliertes T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol und T-2 Tetraol durch eine besonders intensive Detektorantwort pro injizierter Toxinmenge auszeichneten, traten beim Nachweis des acetylierten Neosolaniols Probleme auf, da im Chromatogramm drei Peaks festzustellen waren (vgl. Abb. 6). Diese drei Peaks könnten durch eine unvollständige Derivatisierung der beiden Hydroxylgruppen von Neosolanol hervorgerufen werden; jedoch ist auch ein Zerfall des Neosolanol-Trifluoracetyl-ethers bei der Injektion in den Gaschromatographen denkbar. Das mit Tri-Sil/TBT silylierte Neosolanol erzeugt hingegen nur einen Peak, was zeigt, daß keine Verunreinigungen der Referenzsubstanz vorlag. Die einfache Durchführung (vgl. 2.1.4.1.) spricht für eine Derivatisierung mit MBTFA, hingegen zeichnen sich die silylierten Trichothecen-Derivate durch eine hohe Stabilität aus. Beide Arten der Derivatisierung erlauben den eindeutigen quantitativen Nachweis von 5 ng nicht-makrozyklischer Trichothecene pro Injektion mittels der GC-FID; jedoch ist das Signal-Rauschverhältnis bei der Derivatisierung mit MBTFA günstiger.

Bei den Untersuchungen zur Optimierung der Analytik von Trichothecen im Blutserum, Harn und Kot stellte sich heraus, daß die Extraktion mit Ethylacetat (Blutserum und Harn) oder Acetonitril (Kot) und die anschließende Aufreinigung über eine

eine SEP-PAK C18 Kartusche, Florisilsäule und HPLC-Säule (Harn und Kot) zu den besten Resultaten führte. Alle anderen getesteten Verfahren (vgl. 2.2.3.) erbrachten stark verunreinigte Extrakte, die eine sichere Auswertung der Chromatogramme nahezu unmöglich machten. Speziell die weitere Aufreinigung der Harn- und Kotextrakte mittels HPLC führte zu ausgezeichneten Ergebnissen bezüglich Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate. In diesem Punkt unterscheidet sich diese Methode prinzipiell von den bislang in der Literatur beschriebenen Analysenverfahren für Trichothecene in Körperflüssigkeiten und Exkreten (vgl. MATSUMOTO et al., 1978; YOSHIKAWA et al., 1981; SWANSON et al., 1982; YOSHIKAWA et al., 1982 und MIROCHA et al., 1983a).

Mit diesen Verfahren konnte T-2 Toxin und HT-2 Toxin im Blutserum, Harn und Kot noch bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml bzw. 10 ng/g detektiert werden. Nicht so günstige Ergebnisse werden für T-2 Tetraol erreicht. Zwar wurden im Harn noch Konzentrationen bis zu 25 ng/ml erfaßt, im Blutserum und Kot waren jedoch nur Werte von 100 ng/ml bzw. 200 ng/g nachweisbar. Dies dürfte in erster Linie mit der Polarität und dem damit verbundenen Lösungsverhalten diese Verbindung im Zusammenhang stehen, was auch in der schlechten Wiederfindungsrate zum Ausdruck kommt (vgl. Tabellen: 10, 12, 13). Darüber hinaus konnte eine starke Abhängigkeit der Wiederfindungsraten aller geprüften Trichothecene von ihrer Konzentration im Probenmaterial festgestellt werden: sie sinkt bei Annäherung an die jeweilige Nachweisgrenze erheblich ab (vgl. Tabellen: 10, 12, 13). Die gleich Beobachtung machten COLLINS u. ROSEN, (1979) bei der T-2 Toxin-Analyse in Milch.

Bei den "in vitro" Versuchen zum Metabolismus von T-2 Toxin in S-9 Leberüberständen von Schweinen konnte HT-2 Toxin, 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin, 3'-Hydroxy-T-2 Toxin und ein unbekannter Metabolit, mit ST 1 bezeichnet, festgestellt werden (vgl. Tabelle 14).

YOSHIZAWA et al. (1984) konnten zusätzlich noch Neosolaniol, 4-Deacetylneosolaniol, 15-Deacetylneosolaniol und T-2 Tetraol bei "in vitro" Versuchen mit S-9 Leberüberständen von Mäusen nach T-2 Toxin-Zugabe detektieren.

Für die Deacetylierung des T-2 Toxin-Moleküls werden mikrosomale unspezifische Carboxyesterasen des S-9 Leberüberstandes verantwortlich gemacht (OHTA et al., 1978). Durch den Einsatz von verschiedenen Esterase-Inhibitoren konnten WEI u. CHU (1985) diese Aussage bestätigen.

Des weiteren findet eine Hydroxylierung der Isovalerylgruppe statt. Eine ähnliche Reaktion ist beim Metabolismus von Alkylketten bekannt, die dann zur Bildung eines tertiären Alkohols führt (CIBA GEIGY AG, 1982).

Auf Grund gleicher Rf-Werte könnte ST 1 mit dem ebenfalls nicht näher bestimmten Neosolaniol-Metaboliten SN 1 (vgl. Tabelle 14) identisch sein. Der Vergleich der Rf-Werte der beiden unbekannten Neosolaniol-Metaboliten SN 1 und SN 2 (vgl. Tabelle 14) mit denen von YOSHIZAWA et al. (1984) im S-9 Leberüberstand von Mäusen detektierten T-2 Toxin-Metaboliten 4-Deacetylneosolaniol und 15-Deacetylneosolaniol legt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um die gleichen Substanzen handeln könnte. Der Abbau von Neosolaniol zu T-2 Tetraol konnte bei den eigenen Versuchen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 14).

Nach den eigenen Untersuchungen und den Ergebnissen von YOSHIZAWA et al. (1980 b; 1984) kann eine Metabolisierung von T-2 Toxin gemäß der Darstellung in Abbildung 11 angenommen werden.

Zu berücksichtigen bleibt, daß durch die tierartlich unterschiedliche Enzymausstattung der Leber, qualitativ und quantitativ differierende T-2 Toxin-Metaboliten auftreten können.

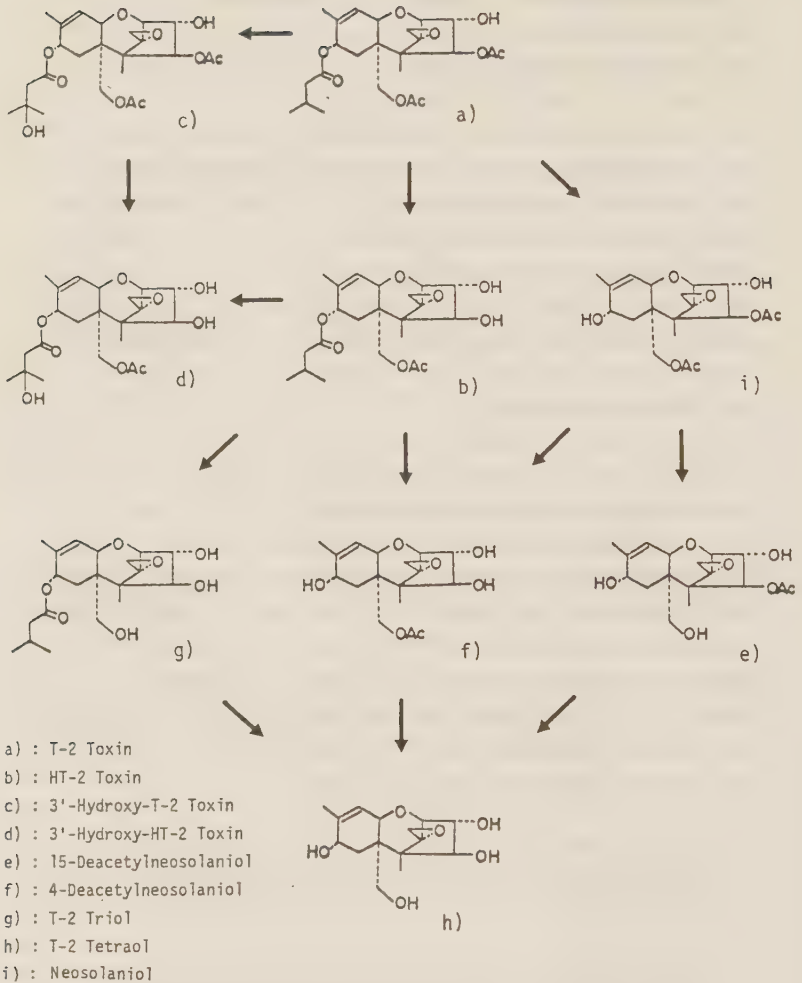


Abbildung 11: Auf Grund eigener Ergebnisse und der von YOSHIZAWA et al. (1984) erzielten Resultate anzunehmende Metabolisierung von T-2 Toxin im Schwein

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Probenmaterials aus dem Tierversuch mit zwei Schweinen zeigen, daß T-2 Toxin nach oraler und intravenöser Applikation sehr rasch zu unterschiedlichen Metaboliten verstoffwechselt wird.

Ähnliche Beobachtungen wurden nach oraler Applikation von T-2 Toxin beim Rind (YOSHIZAWA et al., 1981), beim Huhn (YOSHIZAWA et al., 1980a), bei der Maus (MATSUMOTO et al., 1978) und nach intraperitonealer Injektion beim Huhn (VISCANTI u. MIROCHA, 1985) gemacht.

Bereits eine halbe Stunde nach intravenöser T-2 Toxin-Gabe (2 mg/ kg KGW) konnte neben T-2 Toxin auch HT-2 Toxin als einziger Metabolit im Blutserum detektiert werden (vgl. Tabelle 17 und Abbildung 12). HT-2 Toxin wurde auch im Rinderplasma neben anderen, zum Teil in weit größeren Mengen auftretenden Metaboliten von YOSHIZAWA et al. (1981) analysiert.

Demgegenüber konnte nach oraler Gabe von 2 mg T-2 Toxin / kg KGW im Serum weder dieses Mycotoxin noch ein T-2 Toxin-Metabolit festgestellt werden; dies könnte mit dem Erbrechen eines großen Teils der oral applizierten Toxinmenge und dem raschen Metabolismus von T-2 Toxin erklärt werden.

Im Gegensatz zu ELLISON u. KOTSONIS (1974), die nachdem sie T-2 Toxin in einem magensaftähnlichen Milieu 1 Stunde inkubierten, keine T-2 Toxin-Metaboliten nachweisen konnten, wurde bei eigenen Untersuchungen im Erbrochenem eines Schweines, das mit T-2 Toxin oral belastet wurde, HT-2 Toxin detektiert; inwieweit der pH-Wert oder die Enzyme des Magensaftes beim Umbau von T-2 Toxin beteiligt sind, ist nicht geklärt.

Prinzipiell war festzustellen, daß nach intravenöser Verabreichung von T-2 Toxin größere Mengen an Trichothecenen im Kot als im Harn nachweisbar waren (Ausscheidungsverhältnis innerhalb der ersten 24 Stunden: 7:4). Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von MATSUMOTO et al. (1978), die nach oraler Applikation von T-2 Toxin ein Ausscheidungsverhältnis von 3 : 1

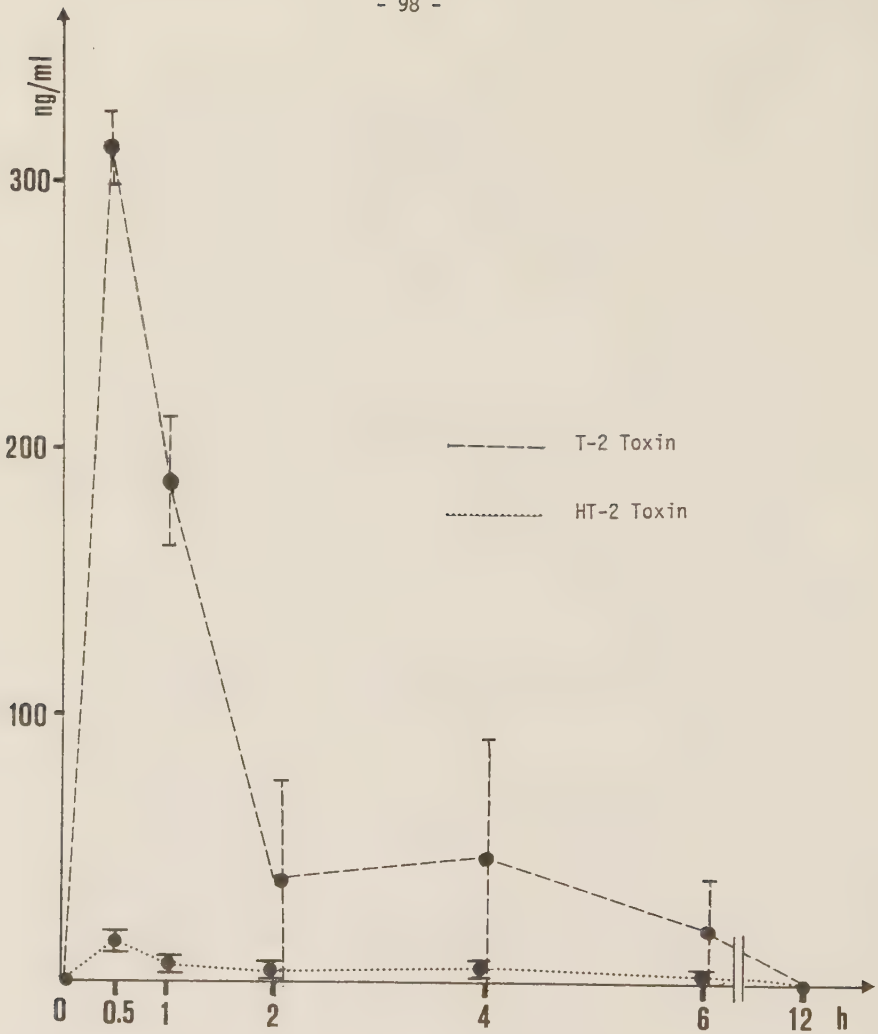


Abbildung 12: Durchschnittliche Konzentration von T-2 Toxin und HT-2 Toxin im Blutserum bei 2 Schweinen nach einmaliger Gabe von 1 mg T-2 Toxin/kg KGW in Abhängigkeit von der Zeit

(Kot : Harn) bei der Maus und von 5 : 1 bei der Ratte diagnostizierten; YOSHIZAWA et al. (1981) geben ein Verhältnis von 7 : 3 (Kot : Harn) nach oraler T-2 Toxin-Gabe beim Rind an.

Während im Schweineharn nach oraler T-2 Toxin-Zufuhr noch geringe Mengen T-2 Toxin nachweisbar waren, konnte nach intravenöser T-2 Toxin-Injektion kein Ausgangstoxin mehr detektiert werden. HT-2 Toxin, 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin und T-2 Triol konnten im Schweineharn bei beiden Arten der Toxingabe analysiert werden; hingegen wurden 3'-Hydroxy-T-2 Toxin, 4-Deacetylneosolaniol und geringe Mengen T-2 Tetraol nur nach intravenöser T-2 Toxingabe im Harn gefunden (vgl. Tabellen 15, 18, 19). Die gleichen Metaboliten, mit Ausnahme von T-2 Triol, wurden auch im Rinderharn (YOSHIZAWA et al., 1981) und in den Exkreten von Hühnern (YOSHIZAWA et al., 1980a) analysiert.

In den Schweinekotproben wurden große Mengen HT-2 Toxin, 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin und T-2 Triol bereits innerhalb der ersten 6 Stunden nach i. v. Applikation von T-2 Toxin gemessen, während nach orale Toxingabe im selben Zeitraum als einziger Metabolit HT-2 Toxin in deutlich geringeren Mengen auftrat. YOSHIZAWA et al. (1981) analysierten im Rinderkot nach oraler Applikation von T-2 Toxin ebenfalls 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin und HT-2 Toxin, während sie T-2 Triol - wie schon im Rinderharn - nicht detektieren konnten.

Neosolaniol, das auf Grund der "in vitro" Versuche mit dem S-9 Leberüberstand von Schweinen als T-2 Toxin-Metabolit zu erwarten wäre, wurde weder im Harn noch im Kot gefunden; dies steht im Einklang mit Untersuchungen von VISCONTI u. MIROCHA (1985), die Neosolaniol in den Exkreten von Hühnern nach intraperitonealer Injektion von T-2 Toxin nicht nachweisen konnten. Hingegen detektierten YOSHIZAWA et al. (1980a) Neosolaniol nach oraler T-2 Toxin-Applikation sowohl in den Ausscheidungen von Hühnern, als auch im Rinderkot (YOSHIZAWA et al., 1981).

Bei allen durchgeführten quantitativen und qualitativen Untersuchungen bleibt zu berücksichtigen, daß die realen Konzentrationen der Toxine höher liegen als die gemessenen; dies steht im engen Zusammenhang mit den schon beschriebenen Wiederfindungsraten.

Hohe Konzentrationen von radioaktiv-markiertem T-2 Toxin bzw. T-2 Toxin-Metaboliten nach oraler Gabe von radioaktiv-markiertem T-2 Toxin an Mäuse in deren Gallenflüssigkeit, lassen auf eine biläre Ausscheidung von T-2 Toxin-Metaboliten schließen (MATSUMOTO et al., 1978).

Von anderen Mykotoxinen wie z.B. Zearalenon ist bekannt, daß sie in konjugierter Form, vor allem als Glukuronide, im Kot ausgeschieden werden (MIROCHA et al., 1981).

Wie sich jedoch in hier nicht näher beschriebenen Untersuchungen zeigte, konnten keine höheren Toxinkonzentrationen im Schweinekot nach Behandlung mit Glukuronidase detektiert werden; dies könnte darauf beruhen, daß T-2 Toxin-Abkömmlinge entweder nicht in der Leber glukuronidiert werden, oder daß die Glukuronide im Darmmilieu wieder aufgespalten werden.

Werden alle im Harn, Kot und Erbrochenem detektierten Toxinmengen addiert, so ergibt sich eine sehr geringe Wiederfindung der bei oraler bzw. intravenöser Applikation eingesetzten Toxinmenge. Diese erhebliche Differenz zwischen eingesetzter und wiedergefundener Toxinmenge könnte im Auftreten noch unbekannter Metaboliten begründet sein.

Erst vor kurzem veröffentlichten YOSHIKAWA et al. (1985) die Entdeckung von de-epoxydierten Metaboliten im Kot von Ratten, die oral mit 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin oder T-2 Tetraol belastet worden waren. Diese, als M1, M2 und M3 bezeichneten Verbindungen, sollen vor allem durch die obligat anaerobe Darmflora gebildet werden und dürften vermutlich auch beim Schwein vorkommen.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Analysenverfahren stehen Methoden zur Verfügung, die es erlauben, Metabolismusstudien von T-2 Toxin und T-2 Toxin-Derivaten im Serum, Harn, Kot und Erbrochenem durchzuführen.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, bei Verdacht einer "T-2 Toxin-Toxikose" mit den erarbeiteten Methoden Harn, Kot und Erbrochenes für die Diagnosestellung zu untersuchen. Auf Grund der raschen Ausscheidung von T-2 Toxin und T-2 Toxin-Metaboliten kommen als Untersuchungsmaterialien für den Nachweis einer "T-2 Toxin-Toxikose" nur Harn- und Kotproben in Frage, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach vermuteter Toxinaufnahme gezogen werden. Der Untersuchung von Blutseren kommt, wie die nach oraler bzw. intravenöser Applikation von T-2 Toxin erzielten Ergebnisse zeigen (vgl. Tabelle 17 und Abbildung 12), keine diagnostische Bedeutung zu.

E) ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Nachweis von T-2 Toxin und T-2 Toxin-Metaboliten in Blutserum, Harn, Kot und Erbrochenem.

Dazu wurden Untersuchungen zum gaschromatographischen Nachweis von T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolaniol und T-2 Tetraol durchgeführt und verschiedene Extraktions- und Aufreinigungsverfahren getestet.

"In vitro" Versuche mit S-9 Leberüberständen vom Schwein sollten erste Hinweise geben, welche T-2 Toxin-Metaboliten in von dieser Tierart gewonnenem Probenmaterial zu erwarten sind. Blutserum, Harn, Kot und Erbrochenes, nach oraler (2 mg/kg KGW) bzw. intravenöser (1 mg/kg KGW) Applikation von T-2 Toxin an zwei Schweine gewonnen, wurde auf das Vorhandensein von T-2 Toxin und T-2 Toxin-Metaboliten untersucht.

Folgende Resultate wurden erzielt:

- 1) 5 ng T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolaniol und T-2 Tetraol Standardtoxin ließen sich nach Derivatisation mit MBTFA (Acetylierungsreaktion) oder Tri-Sil/TBT (Silylierungsreaktion) mit der Gas-Flüssig-Chromatographie - Flammenionisationsdetektion noch eindeutig quantitativ bestimmen.
Die Linearität des Flammenionisationsdetektors war für die oben genannten Toxine im Bereich von 5 ng bis 200 ng / Injektion gegeben.
- 2) Die Extraktion des Probenmaterials mit Ethylacetat (Blutserum und Harn) oder Acetonitril (Kot und Erbrochenes) und die Aufreinigung der Rohextrakte mit einer SEP-PAK C18 Kartusche und anschließend einer Florisilsäule ermöglichte den gaschromatographischen Trichothecennachweis im Blutserum. Erst eine zusätzliche Aufreinigung der Extrakte von Harn,

Kot und Erbrochenem mittels HPLC führte zu einwandfrei auswertbaren Chromatogrammen.

- 3) In artifiziell kontaminierten Blutserumproben (Schwein) waren T-2 Toxin, HT-2 Toxin und T-2 Triol bis zu 10 ng/ml, Neosolaniol bis zu 25 ng/ml und T-2 Tetraol bis zu 100 ng/ml nachweisbar. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate lagen bei 59,5 %, 61,6 %, 32,7 %, 40,5 % und 3,2 % für T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Neosolaniol, T-2 Triol und T-2 Tetraol.
- 4) In artifiziell kontaminierten Harnproben konnten 10 ng/ml T-2 Toxin und HT-2 Toxin und 25 ng/ml Neosolaniol, T-2 Triol und T-2 Tetraol detektiert werden. Als durchschnittliche Wiederfindungsrate konnte 51,7 % für T-2 Toxin, 71,0 % für HT-2 Toxin, 56,1 % für Neosolaniol, 59,4 % für T-2 Triol und 10,6 % für T-2 Tetraol festgestellt werden.
- 5) 10 ng T-2 Toxin und HT-2 Toxin, 100 ng Neosolaniol und T-2 Triol und 200 ng T-2 Tetraol ließen sich in 1 g Kot nachweisen; dabei wurde eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 53,6 % für T-2 Toxin, 72,0 % für HT-2 Toxin, 29,4 % für Neosolaniol, 35,5 % für T-2 Triol und 2,6 % für T-2 Tetraol bestimmt.
- 6) Im S-9-Leberüberstand von Schweinen wurde T-2 Toxin zu 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin, HT-2 Toxin, 3'-Hydroxy-T-2 Toxin und einer Unbekannten ST 1 metabolisiert. HT-2 Toxin wurde als Hauptmetabolit (geschätzter Anteil: 80 %) detektiert.
- 7) Nach Applikation von T-2 Toxin an Schweine konnten im Blutserum, Harn, Kot und Erbrochenem verschiedene T-2 Toxin-Metaboliten analysiert werden.
Bereits eine halbe Stunde nach intravenöser T-2 Toxin-Applikation konnte im Blutserum neben dem Ausgangstoxin auch HT-2 Toxin gefunden werden; meßbare Konzentrationen

von T-2 Toxin und HT-2 Toxin waren 12 Stunden nach T-2 Toxin-Applikation nicht mehr vorhanden.

Hingegen konnte in Harn und Kot eine bis zu 72 Stunden andauernde Ausscheidung von T-2 Toxin-Metaboliten beobachtet werden.

Im Kot wurde HT-2 Toxin, 3'-Hydroxy-HT-2 Toxin und T-2 Triol detektiert; im Harn wurde zusätzlich noch 3'-Hydroxy-T-2 Toxin, T-2 Tetraol und 4-Deacetylneosolaniol gefunden.

SUMMARY

Studies on the analysis of T-2 toxin in blood serum, urine and feces

The presented paper describes the analysis of T-2 toxin and T-2 toxin metabolites in blood serum, urine, feces and vomit.

For that purpose, studies on gaschromatographic analysis of T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 triol, Neosolaniol and T-2 tetraol were carried out and different extraction and cleanup steps were tested.

"In vitro" experiments with S-9 liver fraction were done in order to get preliminary information on T-2 toxin metabolism. The presence of T-2 toxin and T-2 toxin metabolites were examined in blood serum, urine, feces and vomit after oral (2 mg/kg body weight) and intravenous (1 mg/kg body weight) application of T-2 toxin.

The following results were obtained:

- 1) 5 ng of T-2 toxin, HT-2 toxin,, T-2 triol, neosolaniol and T-2 tetraol could be detected definitely by gas-liquid chromatography - flame ionization detection after derivatization with MBTFA (acetylation reaction) or Tri-Sil/TBT (silylation reaction). The detector response of the examined toxins was linear within the limits of 5 to 200 ng per injection.
- 2) The samples were extracted with ethylacetate (blood serum and urine) or acetonitrile (feces and vomit). Gas chromatographic analysis of trichothecenes in blood serum was possible after cleaning up the extracts by SEP-PAK C 18 catridge and florisil column. An additional HPCL - cleanup

of urine and feces extract was necessary to obtain reliable chromatograms.

- 3) As low as 10 ng/ml T-2 toxin , HT-2 toxin , T-2 triol, 25 ng/ml neosolaniol and 100 ng/ml T-2 tetraol were detectable in artificially contaminated blood serum samples. The average percentage recoveries were 59,5 % for T-2 toxin, 61,6 % for HT-2 toxin, 32,7 % neosolaniol, 40,5 % for T-2 triol and 3,2 % for T-2 tetraol.
- 4) As low as 10 ng/ml T-2 toxin and HT-2 toxin, 25 ng/ml neosolaniol, T-2 triol and T-2 tetraol could be detected in artifically contaminated urine samples. The average percentage recoveries were 51,7 % for T-2 toxin, 71,0 % for HT-2 toxin, 56,1 % for neosolaniol, 59,4 % for T-2 triol and 10,6 % for T-2 tetraol.
- 5) As low as 10 ng/g T-2 toxin and HT-2 toxin, 100 ng/g neosolaniol and T-2 triol, 200 ng/g T-2 tetraol could be detected in artificially contaminated feces. The average percentage recoveries were 53,6 % for T-2 toxin, 72,0 % for HT-2 toxin , 29,4 % for neosolaniol, 35,5 % for T-2 triol and 2,6 % for T-2 tetraol
- 6) T-2 toxin was metabolized to 3'-hydroxy HT-2 toxin, HT-2 toxin, 3'-hydroxy T-2 toxin and the unidentified metabolite named ST 1 in the S-9 liver fraction of swine. The main metabolite which could be detected was HT-2 toxin (about 80 %).
- 7) Different T-2 toxin metabolites were analysed in blood serum, urine, feces and vomit after application of T-2 toxin to pigs. In addition to the intravenous injected T-2 toxin, the metabolite HT-2 toxin was found in the blood sera of the pigs already half an hour after toxin application.

None of the toxins (T-2 toxin and HT-2 toxin) were detectable in blood sera 12 hours after application of T-2 toxin.

In contrary to that, an excretion of T-2 toxin metabolites was observed in urine and feces up to 72 hours.

HT-2 toxin, 3'-hydroxy HT-2 toxin and T-2 triol were analysed in feces; additionally 3'-hydroxy T-2 toxin, T-2 tetraol and 4-deacetyl neosolaniol were detected in urine.

F) LITERATURVERZEICHNIS *

BAMBURG, J. R., MARASAS, W. F., RIGGS, N. V., SMALLEY, E. B.,
STRONG, F. M., 1968:

Toxic spiroepoxy compounds from *Fusaria* and
other Hyphomycetes.

Biotechn Bioeng , 10, 445-455

BAMBURG, J. R., STRONG, F. M., 1971:

12, 13-epoxytrichothecenes

In: KADIS, S., CIEGLER, A., AJL. S. J.,

Microbial Toxins Vol. 7, Academic Press, New
York and London, 207-292

BAMBURG, J. R., STRONG, F. M., SMALLEY, E. B., 1969:

Toxins from moldy cereals.

J Agr Food Chem , 17, 443-450

BAUER, J., BOLLWAHN, W., GAREIS, M., GEDEK, B., HEINRITZI, K.,
1985:

Kinetic profiles of diacetoxyscirpenol and two
of its metabolites in blood serum of pigs.

Appl environ Microbiol , 49, 842-845

BAUER, J., GEDEK, B., 1978:

Mykotoxikosen beim Schwein.

Der prakt Tierarzt, 10, 780-785

*: Abkürzungen der Zeitschriften aus:

Leistner, O., 1981:

Internationale Titellabkürzungen (ITA)

Biblio Verlag Osnabrück

BILAI, V. I., 1955:

Fusarii.

Publ Acad Sci Ukr S.S.R. , Kiev

BOOTH, C., 1971:

The genus *Fusarium*.

Commonwealth Mycological Institut, Kew, Surrey,
England

BRENNECKE, L. H., NEUFELD, H. A., 1982:

Pathologic effects and LD 50 doses of T-2 Toxin
in rats by intramuscular, subcutaneous, and
intraperitoneal routes of administration.

Fed Proc , 41, 924

BRUMLEY, W. C., ANDRZEJEWSKI, D., TRUCKSESS, E. W., DREIFUSS,
P. A., ROACH, J. A. G., EPPLEY, R. M., THOMAS,
F. S., THORPE, Ch. W., SPHON, J. A., 1982:

Negative ion chemical ionization mass spectro-
metry of trichothecenes.

Biomed Mass Spectr , 9, 451-458

BUGNICOURT, F., 1939:

Les *Fusarium* et *Cylindrocarpum* de l'Indochine.
Encycl Mycol Paris XI , 206

BURMEISTER, H. R., ELLIS, J.J., HESSELTINE, C.W., 1972:

Survey for *Fusaria* that elaborate T-2 toxin.

Appl Microbiol , 23, 1165-1166

BURMEISTER, H. R., ELLIS, J. J., YATES, S. G., 1971:

Correlation of biological to chromatographic
data for two mycotoxins elaborated by *Fusarium*.

Appl Microbiol , 21, 673-675

- BURMEISTER, H. R., VESONDER, R. F., KWOLEK, W. F., 1980:
Mouse bioassay for Fusarium metabolites:
Rejection or acceptance when dissolved in
drinking water
Appl environ Microbiol , 39, 957-961
- CARSON, M. S., SMITH, T. K., 1983:
Effects of feeding alfalfa and refined plant
fibers on the toxicity and metabolism of T-2
toxin in rats.
J Nutr , 113, 304-313
- CHAN, P. K. C., GENTRY, P. A., 1984:
LD 50 values and serum biochemical changes in-
duced by T-2 toxin in rats and rabbits.
Toxic Appl Pharmac , 73, 402-410
- CHAYTOR, J. P., SAXBY, M. J., 1982:
Development of a method for the analysis of T-2
toxin in maize by gas chromatography-mass
spectrometry.
J Chrom , 237, 107-113
- CHI, M. S., EL-HALAWANI, M. E., WAIBEL, P. E., MIROCHA, C. J.,
1981:
Effects of T-2 toxin on brain catecholamines and
selected blood components in growing chickens.
Poul Sci , 60, 137-141
- CHI, M. S., MIROCHA, C. J., 1978:
Necrotic oral lesions in chickens fed
diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, and crotoxin.
Poul Sci , 57, 807-808
- CIBA GEIGY AG, 1982:
Wissenschaftliche Tabellen Geigy. 8.Auflage
Basel, Schweiz

- CHI, M. S., MIROCHA, C. J., KURTZ, H. J., WEAVER, G., BATES, F., SHIMODA, W., 1977 a:
Effects of T-2 toxin on reproductive performance and health of laying hens.
Poul Sci , 56, 628-637
- CHI, M. S., MIROCHA, C.J., KURTZ, H. J., WEAVER, G. A., SHIMODA, W., 1977 b:
Acute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks and laying hens.
Poul Sci , 56, 103-106
- CHI, M. S., ROBISON, T. S., MIROCHA, C. J., REDDY, K. R., 1978 a:
Acute toxicity of 12,13-epoxytrichothecenes in one-day-old broiler chicks.
Appl environ Microbiol , 35, 636-640
- CHI, M. S., ROBISON, T. S., MIROCHA, C. J., SWANSON, S. P., SHIMODA, W., 1978 b:
Excretion and tissue distribution of radioactivity from tritium-labeled T-2 toxin in chicks.
Toxic Appl Pharmac , 45, 391-402
- CHU, F. S., GROSSMANN, S., WEI, R., MIROCHA, C. J., 1979:
Production of antibody against T-2 toxin.
Appl environ Microbiol , 37, 104-108
- COHEN, H., LAPOINTE, M., 1984:
Capillary gas chromatographic determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, and diacetoxyscirpenol in cereal grains.
J Ass Off Anal Chem , 67, 1105-1107

- COLE, R. J., COX, R. H., 1981:
Handbook of toxic fungal metabolites.
Academic Press, New York, London, Toronto,
Sydney, San Francisco
- COLLINS, G. J., ROSEN, J. D., 1979:
Gas-liquid chromatographic/mass spectrometric
screening method for T-2 in milk.
J Ass Off Anal Chem , 62, 1274-1280
- COLLINS, G. J., ROSEN, J. D., 1981:
Distribution of T-2 toxin in wet-milled corn
products.
J Food Sci , 46, 877-879
- COSGRIFF, T. M., BUNNER, D. P., WANNEMACHER JR., R. W.,
HODGSON, L. A., DINTERMAN, R. E., 1984:
The hemostatic derangement produced by T-2 toxin
in guinea pigs.
Toxic Appl Pharmacol , 76, 454-463
- CULLEN, D., SMALLEY, E. B., CALDWELL, R. W., 1982:
New process for T-2 toxin production.
Appl environ Microbiol , 44, 371-375
- DOERR, J. A., HAMILTON, P. B., BURMEISTER, H. R., 1981:
T-2 toxicosis and bloodcoagulation in young
chickens.
Toxic Appl Pharmac , 60, 157-162
- ELLISON, R. A., KOTSONIS, F. N., 1973:
T-2 toxin as an emetic factor in moldy corn.
Appl Microbiol , 26, 540-543

ELLISON, R. A., KOTSONIS, F. N., 1974:

In vitro metabolism of T-2 toxin.

Appl Microbiol , 27, 423-424

EPPLEY, R. M., 1974:

Sensitivity of brine shrimp (*Artemia salina*) to trichothecenes.

J Ass Off Anal Chem , 57, 618-620

FONTELO, P. A., BEHELER, J., BUNNER, D. L., CHU, F. S., 1983:

Detection of T-2 toxin by an improved radioimmunoassay.

Appl environ Microbiol , 45, 640-643

FORGACS, J., CARLL, W. T., 1962:

Mycotoxinoses. In: BRANDLEY, C. A., JUNGHER, E. L., Advances in veterinary science 7, 274-382, Academic Press, New York

FREEMAN, G.G., MORRIS, R.J., 1949

The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* LINK.

J Biochem , 44, 1-4

FRIEND, S. C. E., HANCOCK, D. S., SCHIEFER, H. B., BABIUK, L. A., 1983:

Experimental T-2 toxicosis in sheep.

Can J comp Med , 47, 291-297

GAREIS, M., BAUER, J., GEDEK, B., 1985:

Fusarientoxine in Futtermitteln. Nachweis und Vorkommen.

Tierärztl Praxis Suppl , 1, 8-19

GEDEK, B., 1980:

Compendium der medizinischen Mykologie.
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

GENDLOFF, E. H., PESTKA, J. J., SWANSON, S. P., HART, L. P.,
1984:

Detection of T-2 toxin in *Fusarium sporotrichioides*-infected corn by enzym-linked immunosorbent assay.

Appl environ Microbiol , 47, 1161-1163

GENTRY, P.A., 1982:

The effect of administration of a single dose of T-2 toxin on blood coagulation in the rabbit.

Can J comp Med , 46, 414-419

GENTRY, P.A., COOPER, M.L., 1981:

Effect of *Fusarium* T-2 toxin on hematological and biochemical parameters in the rabbit.

Can J comp Med , 45, 400-405

GENTRY, P.A., COOPER, M.L., 1983:

Effect of intravenous administration of T-2 toxin on blood coagulation in calves.

Am J Vet Res , 44, 741-746

GERLACH, W., 1970:

Suggestion for an acceptable modern *Fusarium* system.

An Ac Sci Fen , IV Biologica,
Helsinki, 168, 37-49

GODTFREDSEN, W. O., GROVE, J. F., TAMM, C., 1967:

Zur Nomenklatur einer neueren Klasse von
Sesquiterpenen.

Helv Chim A , 174, 1666-1668

GORDON, W. L., 1952:

The occurrence of *Fusarium* species in Canada.

II. Prevalence and taxonomy of *Fusarium* species
in cereal seed.

Can J Bot , 30, 209-251

GREGORY III, J. F. , MANLEY, D., 1981:

High performance liquid chromatographic deter-
mination of aflatoxins in animal tissues and
products.

J Ass Off Anal Chem , 64, 144-151

GROVE, M. D., YATES, S. G., TALLENT, W. H., ELLIS, J. J.,
WOLFF, I. A., KOSURI, N. R., NICHOLS, R. E.,
1970:

Mycotoxins produced by *Fusarium tricinctum* as
possible causes of cattle disease.

J Agr Food Chem , 18, 734-736

HAMILTON, P. B., WYATT, R. D., DOERR, J. A., BURMEISTER, R.,
1974:

Response of laying hens to T-2 toxin.

Poul Sci , 53, 5-6

HARWIG, J., SCOTT, P. M., 1971:

Brine shrimp larvae as a screening system for
fungal toxins.

Appl Microbiol , 21, 1011-1016

- HAYES, M. A., BELLAMY, J. E. C., SCHIEFER, H. B., 1980:
Subacute toxicity of dietary T-2 toxin in mice:
Morphological and hematological effects.
Can J comp Med , 44, 203-218
- HAYES, M. A., SCHIEFER, H. B., 1980:
Subacute toxicity of dietary T-2 toxin in mice:
Influence of protein nutrition.
Can J comp Med , 44, 219-228
- HAYES, M. A., WOBESER, G. A., 1983:
Subacute toxic effects of dietary T-2 toxin in
young mallard ducks.
Can J Comp Med , 47, 180-187
- HOERR, F. J., CARLTON, W. W., YAGEN, B., 1981 a:
The toxicity of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol
in combination for broiler chickens.
Food Cosm Toxicol , 19, 185-188
- HOERR, F. J., CARLTON, W. W., YAGEN, B., 1981 b:
Mycotoxicosis caused by a single dose of T-2
toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens.
Vet Pathol , 18, 652-664
- HOERR, F. J., CARLTON, W. W., YAGEN, B., JOFFE, A. Z., 1982 a:
Mycotoxicosis produced in broiler chickens by
multiple doses of T-2 toxin or DAS.
Avian Pathology, 11, 369-383
- HOERR, F. J., CARLTON, W. W., YAGEN, B., JOFFE, A. Z., 1982 b:
Mycotoxicosis caused by either T-2 toxin or
diacetoxyscirpenol in the diet of broiler
chickens.
Fund Appl Toxic , 2, 121-124,

ICHINOE, M., KURATA, H., 1983:

Trichothecene-producing fungi

In: UENO, Y., Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects; Development in food science 4. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. 73-81

IKEDIOBI, C. O., HSU, I. C., BAMBURG, J. R., STRONG, F. M.,
1971:

Gas-liquid chromatography of mycotoxins of the trichothecene group.

Anal Biochem , 43, 327-340

ISHII, K., 1983:

Chemistry and bioproduction of non-macrocylic trichothecenes.

In: UENO, Y., Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects; Development in food science 4. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. 7-19

JAGADEESAN, V., RUKMINI, C., VIJAYARAGHAVAN, M., TULPUL, P.
G., 1982:

Immune studies with T-2 toxin: Effect of feeding and withdrawal in monkeys.

Fd Chem Toxic , 20, 83-87

JOFFE, A. Z., 1974:

A modern system of Fusarium taxonomy.

Mycop , 53, 201-228

JOFFE, A. Z., PALT, J., 1975:

Taxonomic study of Fusarium of the sporotrichiella section used in recent toxicological work.

Appl Microbiol , 29, 575-579

KAISER, R., 1973:

Chromatographie in der Gasphase. Bd. 1: Gas-Chromatographie.

Bibliographisches Institut Mannheim, Wien, Zürich.

KANAI, K., KONDO, E., 1984:

Decreased resistance to mycobacterial infection in mice fed a trichothecene compound (T-2 toxin).

Jap J med Sci Biol , 37, 97-104

KIESSLING, K.-H., PETTERSON, H., SANDHOLM, K., OLSEN, M., 1984:

Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria.

Appl environ Microbiol , 47, 1070-1073

KOSURI, N. R., GROVE, M. D., YATES, S. G., TALLENT, W. H., ELLIS, J. J., WOLFF, I. A., NICHOLS, R. E., 1970:

Response of cattle to mycotoxins of *Fusarium tricinctum* isolated from corn and fescue.

J Am Vet Med Ass , 157, 938-940

KOSURI, N. R., SMALLEY, E. B., NICHOLS, R. E., 1971:

Toxicologic studies of *Fusarium tricinctum* (Corda) Snyder et Hansen from moldy corn.

Am J Vet Res , 32, 1843-1850

KOTSONIS, F. N., SMALLEY, E. B., ELLISON, R. A., GALE, C. M.,
1975:

Feed refusal factors in pure cultures of
Fusarium roseum "graminearum"
Appl Microbiol , 30, 362-368

LEE, S., CHU, F. S., 1981:

Radioimmunoassay of T-2 toxin in biological
fluids.
J Ass Off Anal Chem , 64, 684-688

LINK, 1809: Mag.Ges. naturf. Freunde, Berlin,
zit. nach: BOOTH, C., 1971:
The genus *Fusarium*.

LUTSKY, I., MOR, N., 1981 a:

Experimental alimentary toxic aleukia in cats.
Lab Anim Sci , 31, 43-47

LUTSKY, I., MOR, N., 1981 b:

Animal model of human disease.
Alimentary toxic aleukia (septic angina, endemic
panmyelotoxicosis, alimentary hemorrhagic
aleukia).
T-2 toxin-induced intoxication of cats.
A J P , 104, 189-191

LUTSKY, I., MOR, N., YAGEN, B., JOFFE, A. Z., 1978

The role of T-2 toxin in experimental alimentary
toxic aleukia: atoxicity study in cats.
Toxic Appl Pharmac , 43, 111-124

- MALALASEKERA, R. A.P., SANDERSON, F. R., COLHOUN, J., 1973:
Fusarium diseases of cereals: IX. Penetration
and invasion of wheat seedlings by *Fusarium*
culmorum and *Fusarium nivale*.
Trans Brit mycol Soc , 60, 453-462
- MANN, D. D., BUENING, G. M., HOOK, B. S., OSWEILER, G. D.,
1982:
Effect of T-2 toxin on the bovine immune system:
Humoral factors.
Infect Immun , 36, 1249-1252
- MANN, D. D., BUENING, G. M., HOOK, B., OSWEILER, G. D., 1983:
Effects of T-2 mycotoxin on bovine serum
protein.
Am J Vet Res , 44, 1757-1759
- MANN, D. D., BUENING, G. M., OSWEILER, G. D., HOOK, B., 1984:
Effect of subclinical levels of T-2 toxin on the
bovine cellular immune system.
Can J comp Med , 48, 308-312
- MARASAS, W. F. O., BAMBURG, J. R., SMALLEY, E. B., STRONG, F.
M., RAGLAND, W. L., DEGURSE, P. E., 1969:
Toxic effects on trout, rats, and mice of T-2
toxin produced by the fungus *Fusarium tricinctum*
(Cd.) Snyder et Hansen.
Toxic Appl Pharmac , 15, 474-482
- MARASAS, W. F. O., DEGURSE, P. E., BAMBURG, J. R., NICHOLS, R.
E., 1967:
Acute toxicity to rainbow trout of a metabolite
produced by the fungus *Fusarium tricinctum*.
Nature, 214, 817-818

MATSUMOTO, H., ITO, T., UENO, Y., 1978:

Toxicological approaches to the metabolite of Fusaria. XII Fate and distribution of T-2 toxin in mice.

Jap J exp Med , 48, 393-399

MIROCHA, C. J., 1979:

Trichothecene toxins produced by Fusarium.

In: SHIMODA, W., Conference on mycotoxins in animal feeds and grains related to animal health National technical information service, Springfield, 288-373

MIROCHA, C. J., 1983 a:

Effect of trichothecene mycotoxin on farm animals.

In: UENO, Y., Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects; Development in food science 4. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. 177-194

MIROCHA, C. J., PATHRE, S. V., BEHRENS, J., 1976:

Substances interfering with the gas-liquid chromatographic determination of T-2 mycotoxin. J Ass Off Anal Chem , 59, 221-223

MIROCHA, C. J., PATHRE, S. V., CHRISTENSEN, C. M., 1977:

Chemistry of Fusarium and Stachybotrys mycotoxins.

In: WYLLIE, Th. D., MOREHOUSE, L. G., Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses (An encyclopedic handbook), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 365-420

MIROCHA, C. J., PATHRE, S. V., ROBISON, T. S., 1981:

Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk.

Food Cosmet Toxicol , 19, 25-30

- MIROCHA, C. J., PAWLOSKY R. A., CHATTERJEE, K., WATSON, S.,
HAYES, W., 1983 :
Analysis for Fusarium toxins in various samples
implicated in biological warfare in Southeast
Asia.
J Ass Off Anal Chem , 66, 1485-1499
- MÜLLER, E., 1974:
Was sind Schimmelpilze und Hefen?
Alimenta , 13, 50-53
- DeNICOLA, D. B., REBAR, A. H., CARLTON, W. W., YAGEN, B., 1978:
T-2 toxin mycotoxicosis in the guinea-pig.
Food Cosm Toxicol , 16, 601-609
- OHTA, M., ISHII, K., UENO, Y., 1977:
Metabolism of trichothecene mycotoxins.
I. Microsomal deacetylation of T-2 toxin in
animal tissues.
J Biochem , 82, 1591-1598
- OHTA, M., MATSUMOTO, H., ISHII, K., UENO, Y., 1978:
Metabolism of trichothecene mycotoxins.
II. Substrate specificity of microsomal deacety-
lation of trichothecenes.
J Biochem , 84, 697-706
- PATHRE, S. V., MIROCHA, C. J., 1977:
Assay methods for trichothecenes and review
of their natural occurrence.
In: RODRICKS, J. V., HESSELTINE, C. W.,
MEHLMAN, M. A.,
Mycotoxins in human and animal health.
Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart, 229 - 253

PATHRE, S. V., MIROCHA, C. J., CHRISTENSEN, C. M., BEHRENS, J.,
1976:

Monoacetoxyscirpenol: a new mycotoxin produced
by *Fusarium roseum* "gibbosum".

J Agr Food Chem , 24, 97-103

PATTERSON, D. S. P., MATTHEWS, J. G., SHREEVE, B. J., ROBERTS,
B. A., McDONALD, S. M., HAYES, A. W., 1979:

The failure of trichothecene mycotoxins and
whole cultures of *Fusarium tricinctum* to cause
experimental haemorrhagic syndromes in calves
and pigs.

Vet Rec , 105, 252-255

PAWLOSKY, R. J., MIROCHA, C. J., YOSHIZAWA, T., 1984:

Reaction products (isomers) of two metabolic
derivatives of T-2 toxin (TC-1 and TC-3) when
reacted with trifluoroacetic acid anhydride

J Agr Food Chem , 32, 1423-1425

PEARSON, A. W., 1978:

Biochemical changes produced by *Fusarium* T-2
toxin in the chicken.

Res vet Sci , 24, 92-97

PETERS, H., DIERICH, M. P., DOSE, K., 1982:

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection
of T-2 toxin.

Z Physiol Chem , 363, 1437-1441

RAFAI, P., TUBOLY, S., 1982:

Effects of T-2 toxin on adrenocortical function
and immune response in growing pigs.

Zbl Vet Med , 29, 558-565

RIBELIN, W. E., 1978:

Trichothecene toxicosis in cattle.

In: WYLLIE, Th. D., MOREHOUSE, L. G., Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses (An encyclopedic handbook), Vol 2, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 36-45

RICHTER, R. J., SCHWARZ, H., 1978:

Chemische Ionisation - ein stark Bedeutung gewinnendes massenspektrometrisches Analyseverfahren.

Ang Chem , 90, 449-469

ROBISON, T. S., MIROCHA, C. J., KURTZ, H. J., BEHRENS, J. C., CHI, M. S., WEAVER, G. A., NYSTROM, S. D., 1979:

Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk.

J Da Sci , 62, 637-641

ROMER, T. R., BOLING, T. M., McDONALD, J. L., 1978:

Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds.

J Ass Off Anal Chem , 61, 801-808

ROSENSTEIN, Y., LAFARGE-FRAYSSINET, C., 1983:

Inhibitory effects of fusarium T-2 toxin on lymphoid DNA and protein synthesis

Toxic Appl Pharmac , 70, 283-288

- ROSENSTEIN, Y., LAFARGE-FRAYSSINET, C., LESPINATS, G.,
LOISILLIER, F., LAFONT, P., FRAYSINET, C.,
1979:
Immunosuppressive activity of fusarium toxins.
Effects on antibody synthesis and skin grafts of
crude extracts, T-2 toxin and diacetoxyscirpenol
Immun , 36, 111-117
- RUKMINI, C., PRASAD, J. S., RAO, K., 1980:
Effects of feeding T-2 toxin to rats and
monkeys.
Food Cosm Toxicol , 18, 267-269
- SANO, A., ASABE, Y., TAKITANI, S., UENO, Y., 1982:
Fluorodensitometric determination of tricho-
thecene mycotoxins with nicotinamide and 2-
acetylpyridine on a silica gel layer.
J Chrom , 235, 257-265
- SAITO, M., OHTSUBO, K., 1974:
Trichothecene toxins of Fusarium species.
In: Purchase, I. H. F., Mycotoxins,
Elsevier Scientific Publishers Co.,
Amsterdam, Oxford, New York, 262-281
- SATO, N., UENO, Y., 1977
Comparative toxicities of trichothecenes.
In: RODRICKS, J. V., HESSELTINE, C. W., MEHL-
MAN , M. A., Mycotoxins in human and animal
health.
Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Ver-
lag, Stuttgart, 295-307

- SATO, N., UENO, Y., ENOMOTO, M., 1975:
Toxicological approaches to the toxic
metabolites of fusaria.
VIII. Acute and subacute toxicities of T-2 toxin
in cats.
Jap J Pharm , 25, 263-270
- SCHIEFER, H. B., HANCOCK, D. S., 1984:
Systemic effects of topical application of T-2
toxin in mice.
Toxic Appl Pharmac , 76, 464-472
- SCHOENTAL, R., JOFFE, A., YAGEN, B., 1979:
Cardiovascular lesions and various tumors found
in rats given T-2 toxin, a trichothecene meta-
bolite of Fusarium.
Canc Res , 39, 2179-2189
- SCOTT, P. M., LAU, P., KANHERE, S. R., 1981:
Gas chromatography with electron capture and
mass spectrometric detection of deoxynivalenol
in wheat and other grains.
J Ass Off Anal Chem , 64, 1364-1371
- SCOTT, P. M., LAWRENCE, J. W., WALBEEK, W. van, 1970:
Detection of mycotoxins by thinlayer chroma-
tography: Application to screening of fungal
extracts.
Appl Microbiol , 20, 839-842
- SMALLY, E. B., 1973:
T-2 toxin.
J Am vet med Ass , 163, 1278-1281

SMITH, R. D., UDSETH, H. R., 1983:

Direct supercritical fluid injection mass
spectrometry of trichothecenes.
Biomed Mass Spectr , 10, 577-580

SNYDER, W. C., HANSEN, N. N., 1945:

The species concept in *Fusarium* with reference
to discolor and other sections.
Am J Bot , 32, 657-666

SPEERS, G. M., MIROCHA, C. J., CHRISTENSEN, C. M., BEHRENS, J.
C., 1977:

Effects on laying hens of feeding corn invaded
by two species of *Fusarium* and pure T-2
mycotoxin.
Poul Sci , 56, 98-102

SPICHER, G., 1981:

Schimmelpilze und Mykotoxine in Getreide.
In: REISS, J., Mykotoxine in Lebensmitteln.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York,
343-380

STAHR, H. M., KRAFT, A.A., SCHUH, M., 1979:

The determination of T-2 toxin, diacetoxyscir-
penol and deoxynivalenol in foods and feeds.
Appl Spectrosc , 33, 294-297

SWANSON, S. P., RAMASWAMY, V., BEASLEY, V. R., BUCK, W. B.,
BURMEISTER, H. H., 1983:

Gas-liquid chromatographic determination of T-2
toxin in plasma.
J Ass Off Anal Chem , 66, 909-912

- SWANSON, S. P., TERWEL, L., CORLEY, R. A., BUCK, W. B., 1982:
Gas chromatographic method for determination of
diacetoxyscirpenol in swine plasma and urine.
J Chrom , 248, 456-460
- SZATHMARY, C. I., MIROCHA, C. J., PALYUSIK, M., PATHRE, S. V.,
1976:
Identification of mycotoxins produced by species
of *Fusarium* and *Stachybotrys* obtained from
Eastern Europe.
Appl environ Microbiol , 32, 579-584
- TAKITANI, S., ASABE, Y., 1983:
Thin-layer chromatographic analysis of tricho-
thecen mycotoxins.
In: UENO, Y., *Trichothecenes - chemical, bio-
logical and toxicological aspects; Development
in food science 4*. Elsevier Science Publishers
B. V., Amsterdam. 113-120
- TAKITANI, S., ASABE, Y., KATO, T., SUZUKI, M., UENO, Y., 1979:
Spectrodensitometric determination of tricho-
thecene mycotoxins with 4-(p-nitrobenzyl)pyri-
dine on silica gel thin-layer chromatograms.
J Chrom , 172, 335-342
- TAMM, C., 1977:
Chemistry and biosynthesis of trichothecenes.
In: RODRICKS, J. V., HESSELTINE, C. W.,
MEHLMAN, M. A.,
Mycotoxins in human and animal health.
Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart, 209 - 228

TERAO, K., KERA, K., YAZIMA, T., 1978:

The effects of trichothecene toxins on the bursa
of fabricius in day-old chicks.

Virchow's Archiv , B Cell Path., 27, 359-370

UENO, Y., 1977 b:

Mode of action of trichothecenes.

Ann Nutr Alim , 31, 885-900

UENO, Y., 1977 a:

Trichothecenes: Overview address.

In: RODRICKS, J. V., HESSELTINE, C. W.,

MEHLMAN, M. A.,

Mycotoxins in human and animal health.

Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart, 189-201

UENO, Y., 1980:

Trichothecene mycotoxins - mycology, chemistry
and toxicology.

In: DRAPER, H. H., Advances in nutritional
research, Vol. 3, Plenum Publishing Corporation,
301-353

UENO, Y., 1983 :

General toxicology.

In: UENO, Y., Trichothecenes -chemical, bio-
logical and toxicological aspects; Developments
in food science 4.

Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam,
135-145

UENO, Y., 1984:

Toxicological features of T-2 Toxin and related trichothecenes.

Fund Appl Toxicol , 4, 124-132

UENO, Y., ISHII, K., SAKAI, K., KANAEDA, S., TSUNODA, H.,
TANAKA, T., ENOMOTO, M., 1972:

Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. IV. Microbial survey on "beanhulls poisoning of horses", with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of *Fusarium solani* M-1-1.

Jap J exp Med , 42, 187-203

UENO, Y., NAKAYAMA, K., ISHII, K., TASHIRO, F., MINODA, Y.,
OMORI, T., KOMAGATA, K., 1983 b:

Metabolism of T-2 toxin in *Curtobacterium* sp. strain 114-2

Appl environ Microbiol , 46, 120-127

UENO, Y., SATO, N., ISHII, K., SAKAI, K., TSUNODA, H., ENOMOTO, M., 1973 b:

Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species.

Appl Microbiol , 25, 699-704

UENO, Y., SATO, N., ISHII, K., SHIMADA, N., TOKITA, K.,
ENOMOTO, M., SAITO, M., OHOTSUBO, K., UENO, I., 1973 a:

Subacute toxicity of trichothecene-mycotoxins of *Fusarium* to cats and mice.

Jap J Pharm Suppl , 23, 133

UENO, Y., SAWANO, M., ISHII, K., 1975:

Production of trichothecene mycotoxins by
fusarium species in shake culture.
Appl Microbiol , 30, 4-9

VISCONTI, A., MIROCHA, C. J., 1985:

Identification of various T-2 toxin metabolites
in chicken excreta and tissues.
Appl environ Microbiol , 49, 1246-1250

VISCONTI, A., MIROCHA, C.J., BOTTALICO, A., CHELKOWSKI, J.,
1985:

Trichothecene mycotoxins produced by Fusarium
sporotrichioides strain P-11.
Mycotoxin Research, 1, 3-10

WATSON, S. A., MIROCHA, C. J., HAYES, A. W., 1984:

Analysis for trichothecenes in samples from
Southeast Asia associated with "Yellow Rain".
Fund Appl Toxicol , 4, 700-717

WEAVER, G. A., KURTZ, H. J., BATES, F. Y., 1981:

Diacetoxyscirpenol toxicity in pigs.
Res vet Sci , 31, 131-135

WEAVER, G. A., KURTZ, H. J., BATES, F. Y., CHI, M.S., MIROCHA,
C. J., BEHRENS, J. C., ROBISON, T. S., 1978 a:

Acut and chronic toxicity of T-2 mycotoxin in
swine.
Vet Rec , 103, 531-535

WEAVER, G. A., KURTZ, H. J., MIROCHA, C. J., BATES, F. Y.,
BEHRENS, J. C., ROBISON, T. S., GIPP, W. F.,
1978 b:

Mycotoxin-induced abortions in swine.

Can Vet J , 19, 72-74

WEAVER, G. A., KURTZ, H. J., MIROCHA, C. J., BATES, F. Y.,
BEHRENS, J. C., ROBISON, T. S., 1978 c:

Effect of T-2 toxin on porcine reproduction.

Can Vet J , 19, 310-314

WEAVER, G. A., KURTZ, H. J., MIROCHA, C. J., BATES, F. Y.,
BEHRENS, J. C., ROBISON, T. S., SWANSON, S. D.
1980:

The failure of purified T-2 Mycotoxin to produce
hemorrhaging in dairy cattle.

Can Vet J , 21, 210-213

WEI, R. D., CHU, F. S., 1985:

Modification of in vitro metabolism of T-2 toxin
by esterase inhibitors.

Appl environ Microbiol , 50, 115-119

WERMTER, R., 1980:

Untersuchung des Toxinbildungsvermögens in
Futtermitteln vorkommender Fusarien mit physi-
kalisch-chemischen und biologischen Methoden.
Diss Vet Med , Ludwig-Maximilians-Universität
München

- WILSON, C. A., EVERARD, D. M., SCHOENTAL, R., 1982:
Blood pressure changes and cardiovascular
lesions found in rats given T-2 toxin, a tricho-
thecene secondary metabolite of certain *Fusarium*
microfungi.
Toxicology Letters, 10, 35-40
- WOLLENWEBER, H. W., 1932:
Die Gattung *Fusarium*.
In: SORAUER, P., *Handbuch der Pflanzenkrankhei-*
ten, Bd. III. Die pflanzlichen Parasiten.
Paul Parey Verlag, Berlin
- WOLLENWEBER, H. W., REINKING, O. A., 1935:
Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung
und Bekämpfung.
Paul Parey Verlag, Berlin
- WYATT, R. D., COLWELL, W. M., HAMILTON, P. B., BURMEISTER, H.
R., 1973 a:
Neural disturbances in chickens caused by
dietary T-2 toxin.
Appl Microbiol , 26, 757-761
- WYATT, R. D., DOERR, J. A., HAMILTON, P. B., BURMEISTER, H. R.,
1975 a:
Egg production, shell thickness, and other
physiological parameters of laying hens affected
by T-2 toxin.
Appl Microbiol , 29, 641-645
- WYATT, R. D., HAMILTON, P. B., BURMEISTER, H. R., 1973 b:
The effects of T-2 toxin in broiler chickens.
Poul Sci , 52, 1853-1859

- WYATT, R. D., HAMILTON, P. B., BURMEISTER, H. R., 1975 b:
Altered feathering of chicks caused by T-2
toxin.
Poul Sci , 54, 1042-1045
- WYATT, R. D., WEEKS, B. A., HAMILTON, P. B., BURMEISTER, H. R.,
1972:
Severs oral lesions in chickens caused by ingestion of dietary fusariotoxin T-2.
Appl Microbiol , 24, 251-257
- YAROM, R., MORE, R., SHERMAN, Y., YAGEN, B., 1983:
T-2 toxin-induced pathology in the hearts of rats.
Br J Exp Path , 64, 570-577
- YOSHIKAWA, T., MIROCHA, C. J., BEHRENS, J. C., SWANSON, S. P.,
1981:
Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow.
Food Cosm Toxicol , 19, 31-39
- YOSHIKAWA, T., OKAMOTO, K., SAKAMOTO, T., KUWAMURA, K., 1985:
In vivo metabolism of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin.
On formation of depoxydation products.
Proc Jap Ass Mycotoxicol , 21, 9-12
- YOSHIKAWA, T., SAKAMOTO, T., AYANO, Y., MIROCHA, C. J., 1982:
3'-Hydroxy T-2 and 3'-Hydroxy HT-2 toxins:
New metabolites of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in animals.
Agric Biol Chem , 46, 2613-2615

YOSHIZAWA, T., SAKAMOTO, T., OKAMOTO, K., 1984:

In vitro formation of 3'-Hydroxy T-2 and
3'-Hydroxy HT-2 toxin by liver homogenates from
mice and monkeys.

Appl environ Microbiol , 47, 130-134

YOSHIZAWA, T., SWANSON, S. P., MIROCHA, C.J., 1980 a:

T-2 metabolites in the excreta of broiler
chickens administrated 3H-labeled T-2 toxin.

Appl environ Microbiol , 39, 1172-1177

YOSHIZAWA, T., SWANSON, S. P., MIROCHA, C. J., 1980 b:

In vitro metabolism of T-2 toxin in rats.

Appl environ Microbiol , 40, 901-906

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. B. Gedek für die Überlassung des Themas und ihre stets freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. hc. mult. A. Mayr danke ich besonders für die mir bereitwillig gewährte Arbeitsmöglichkeit.

Herrn Dr. J. Bauer möchte ich für seine wertvollen fachlichen Ratschläge und die mir jederzeit gewährte freundliche Aussprache über die Durchführung meiner Arbeit sehr herzlich danken.

Herrn Dr. M. Gareis danke ich für sein stetes Interesse und seine hilfreichen Ratschläge.

LEBENS LAUF

Name : Kabilka

Vorname : Günther

Geburtsdatum : 29-10-1956

Geburtsort : Bayreuth, Bayern

Eltern : Elisabeth Kabilka, geb. Haubfleisch
Rudolf Kabilka

Schul Ausbildung : Volksschule Herzog-Höhe, Bayreuth
1963 - 1968
Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth
1968 - 1978
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
29-06-1978

Studium : Tiermedizinisches Studium an der Tierärzt-
lichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München
1978 - 1984
Abschluß: Staatsexamen am 21-03-1984

Approbation : 08-05-1984

Promotionstudium : Ab April 1984 am Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchen-
medizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

